

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“Caracterización de las comunidades microbianas en suelos cultivados con
banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.”**

Tesis previa a la obtención del

Título de Ingeniero Agrónomo

Autor:

Jeancarlos Eded Giler Mendoza

DIRECTOR: Ing. Fernando Gerardo Bermúdez Ph.D.

CO-DIRECTOR: Blgo. Luis Andrés Yarzábal Rodríguez Ph.D.

CUENCA - ECUADOR

2017



RESUMEN

El suelo es un hábitat complejo y heterogéneo colonizado por una gran diversidad de microorganismos. Una de las principales limitaciones al momento de caracterizar comunidades microbianas es que las metodologías clásicas dependientes de cultivo no permiten estudiar los efectos que sobre estas comunidades causan el manejo y la producción de los cultivos. A continuación se describen las diferencias y similitudes entre comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional. Para ello se seleccionaron cinco pares de sitios de muestreo cultivados con banano, se tomaron de 0,25 g de suelo rizosférico y se procedió a extraer el ADN ambiental (metagenoma) usando un kit de extracción. La amplificación de los marcadores moleculares 16S ADNr (bacterias) y región ITS (hongos) se realizó por touchdown PCR utilizando los cebadores universales ITS1-ITS4 / ITS1FGC-ITS2 para la región ITS y F968GC-1401R para el gen que codifica el ADNr 16S; luego se analizó la diversidad, riqueza y estructura bacteriana y fúngica mediante la técnica de Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y se calcularon diferentes índices. Los resultados obtenidos demuestran que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las comunidades de suelos orgánicos y las comunidades de suelos convencionales.

PALABRAS CLAVES: SUELO RIZOSFÉRICO, METAGENOMA, TOUCHDOWN PCR, REGIÓN ITS, GEN ADNr 16S, ÍNDICE DE DIVERSIDAD, DGGE.



ABSTRACT

Soil is a complex and heterogeneous habitat colonized by a great diversity of microorganisms. One of the main limitations when characterizing microbial communities is that culture-dependent classical methodologies do not allow to study the effects caused on them as a community by crop management and production. The differences and similarities between the microbial communities in soils cultivated with banana under the management systems: organic and conventional are described below. For this, five paired sampling sites (banana plantations) were selected, 0.25 g of rhizosphere soil were collected and the environmental DNA (metagenome) was extracted from these samples. Afterwards, fragments of the 16S rDNA (bacteria) and ITS region (fungi) rDNA were amplified by PCR and the electrophoresed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Diversity indexes (richness, Shannon and equitability) were calculated and sample cluster analysis was conducted from DGGE profiles. The results showed no significant differences ($p > 0.05$) between the bacterial and fungal communities in organically and conventionally managed soils.

KEYWORDS: RHEOSPHERE SOIL, METAGENOME, TOUCHDOWN PCR, ITS REGION, 16S ADNr, DIVERSITY INDEX, DGGE.



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	15
2.	JUSTIFICACIÓN.....	16
3.	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo general	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
5.1	Importancia de las comunidades microbianas para la producción agrícola	18
5.1.1	Reciclaje de nutrientes	18
5.1.2	Producción de fitohormonas.....	20
5.1.3	Antagonismo o inhibición de patógenos	21
5.2	Impactos antrópicos sobre las comunidades microbianas en el sector agrícola	21
5.3	Métodos de estudio de las comunidades microbianas	23
5.3.1	Técnicas tradicionales.....	23
5.3.2	Técnicas moleculares.....	24
5.4	Fundamentos de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).....	29
5.5	Aplicaciones de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) en el campo de la microbiología del suelo	30
5.6	Ventajas y Desventajas del uso de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para la caracterización de comunidades microbianas.....	31
5.7	Índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (UTOs).....	33
5.7.1	Índice de Shannon Weaver	33
5.7.2	Medición de la riqueza específica	33
5.7.3	Índice de Equitatividad de Pielou	33
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1	Área de estudio	34
6.2	Área de ejecución del proyecto.....	35
6.3	Selección de sitios de estudio, caracterización cultural y recolección de muestras	35



6.4	Caracterización físico-química	36
6.4.1	Análisis Físicos	36
6.4.2	Análisis químicos	39
6.5	Extracción de ADN	40
6.6	Amplificación por PCR.....	40
6.6.1	Amplificación por touchdown PCR para la región ITS	40
6.6.2	Amplificación por PCR para ARNr 16S	42
6.7	Parámetros de DGGE para el ARNr 16S	43
6.8	Parámetros de DGGE para la región ITS.....	44
6.9	Análisis de datos.....	45
7.	RESULTADOS	47
7.1	Análisis físico-químicos.....	47
7.2	Extracción del ADN metagenómico.....	48
7.3	Amplificación por touchdown PCR para la región ITS	50
7.4	Amplificación por PCR para ARNr 16S	51
7.5	Parámetros de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para el ARNr 16S	52
7.6	Parámetros de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para la región ITS	55
7.7	Análisis de la riqueza, estructura y diversidad biológica.....	57
7.8	Comparación entre las características físico-químicas del suelo, riqueza e índices de diversidad respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional	61
7.9	Correlación entre los índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas frente a las características físico-químicas del suelo	62
8.	DISCUSIÓN.....	63
9.	CONCLUSIONES	66
10.	RECOMENDACIONES	67
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
12.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coordenadas de Ubicación de los sitios de muestreo.	34
Tabla 2: Concentraciones de los reactivos utilizados en la touchdown PCR.	41
Tabla 3: Concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR anidada.	41
Tabla 4: Concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR.	43
Tabla 5: Características físico-químicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	47
Tabla 6: Valores promedios de los Índices de Diversidad de las comunidades bacterianas (región 16S) de las muestras de suelo en sistemas de manejo orgánico y convencional, calculados a partir de los perfiles generados por la técnica de DGGE.	57
Tabla 7: Valores promedios de los Índices de Diversidad de las comunidades fúngicas (región ITS) de las muestras de suelo en sistemas de manejo orgánico y convencional, calculados a partir de los patrones de bandas generados por la técnica de DGGE.	57
Tabla 8: Prueba t ($p < 0,05$) y prueba U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para las características físico-químicas del suelo, riqueza e índices de diversidad respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional.	61
Tabla 9: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de arcilla ($< 2 \mu\text{m}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	82
Tabla 10: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de arcilla.	82
Tabla 11: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de limo ($2-63 \mu\text{m}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	83
Tabla 12: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de limo.	83
Tabla 13: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de arena ($63-2000 \mu\text{m}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	84
Tabla 14: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de arena.	84
Tabla 15: Estadísticos descriptivos de la variable física (d.a.) densidad aparente (gr/cm^3) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	85
Tabla 16: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física densidad aparente.	85
Tabla 17: Estadísticos descriptivos de la variable física (d.r.) densidad real (gr/cm^3) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	86
Tabla 18: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física densidad real.	86
Tabla 19: Estadísticos descriptivos de la variable física porosidad (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	87
Tabla 20: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física porosidad.	87
Tabla 21: Estadísticos descriptivos de la variable física humedad (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	88
Tabla 22: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física humedad.	88
Tabla 23: Estadísticos descriptivos de la variable física Saturación de agua (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	89
Tabla 24: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física saturación de agua.	89
Tabla 25: Estadísticos descriptivos de la variable química (C.E.) Conductividad eléctrica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	90
Tabla 26: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química conductividad eléctrica.	90
Tabla 27: Estadísticos descriptivos de la variable química pH en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.	91
Tabla 28: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química pH.	91



Tabla 29: Estadísticos descriptivos de la variable química (M.O.S.) materia orgánica (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	92
Tabla 30: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química materia orgánica del suelo.....	92
Tabla 31: Estadísticos descriptivos de la variable química (C.O.S.) carbono orgánico (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	93
Tabla 32: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química carbono orgánico del suelo.....	93
Tabla 33: Estadísticos descriptivos de la variable (H-ITS) índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	94
Tabla 34: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas.....	94
Tabla 35: Estadísticos descriptivos de la variable (H-16S) índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	95
Tabla 36: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas.....	95
Tabla 37: Estadísticos descriptivos de la variable (S-ITS) riqueza en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	96
Tabla 38: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable riqueza en comunidades fúngicas.....	96
Tabla 39: Estadísticos descriptivos de la variable (S-16S) riqueza en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	97
Tabla 40: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable riqueza en comunidades bacterianas.....	97
Tabla 41: Estadísticos descriptivos de la variable (EH-ITS) Equitatividad en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	98
Tabla 42: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable Equitatividad en comunidades fúngicas.....	98
Tabla 43: Estadísticos descriptivos de la variable (E _H -16S) Equitatividad en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.....	99
Tabla 44: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable Equitatividad en comunidades bacterianas.....	99
Tabla 45: Correlación de Rho de Spearman entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.....	101
Tabla 46: Correlación de Pearson entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principio de la DGGE; Fuente: (Cornejo Romero et al. 2014).	29
Figura 2: Ubicación a nivel continental, provincial y cantonal del área de estudio; Fuente: SNI	34
Figura 3: Representación esquemática del gen ribosomal ARNr 18S y la región ITS; Fuente: Embong et al. (2008).	40
Figura 4: Representación esquemática del operón (rrn), donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr 23S (rrl), 16S (rrs) y 5S (rrf); Fuente: Rodicio y Mendoza (2004).	42
Figura 5: Alícuotas de la extracción de ADN metagenómico sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v.	48
Figura 6: Alícuotas de la segunda extracción de ADN metagenómico de la muestras 1040 y 1043, sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v.	49
Figura 7: Verificación de la integridad y estabilidad del material genético al cabo de tres meses de almacenamiento a – 20 °C.	49
Figura 8: Amplificación por TD-PCR de la región ITS con los cebadores ITS1F-ITS4 sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 500-650 pb aproximadamente.	50
Figura 9: Amplificación por PCR anidada de la región ITS con los cebadores ITS1FGC-ITS2 sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 300-400 pb aproximadamente.	51
Figura 10: Amplificación por TD-PCR del ARNr 16S con los cebadores F968GC-1401R sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 300-400 pb aproximadamente.	52
Figura 11: Geles de DGGE con una rango desnaturalizante de 30% a 80%.	52
Figura 12: a) Gel DGGE con 40% - 70% de desnaturalizante; b) Gel DGGE con 30% - 60% de desnaturalizante y c) Gel DGGE con 30% - 55% de desnaturalizante.	53
Figura 13: Perfil DGGE con un rango desnaturalizante de 35% a 55% para el ARNr 16S en comunidades bacterianas bajo manejo orgánico y convencional; m= marcador correspondiente a azucena convencional (muestra 1035).	54
Figura 14 : a) Gel DGGE con 30% - 50% de desnaturalizante; b) Gel DGGE con 25% - 40% de desnaturalizante y c) Gel DGGE con 20% - 35% de desnaturalizante.	55
Figura 15: Perfil DGGE con un rango desnaturalizante de 20% a 35% para la región ITS en comunidades fúngicas bajo manejo orgánico y convencional; m= marcador correspondiente a lechuga convencional (muestra 1020).	56
Figura 16: Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA (1), WPGMA (2), Neighbour Joining (3), Single Linkage (4) y Complete Linkage (5) de perfiles de DGGE de fragmentos amplificados de la región ITS de hongos (a) y del gen que codifica al ARNr 16S para bacterias (b) a partir de ADN metagenómico en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico.	60
Figura 17: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de arcilla (< 2 µm).	82
Figura 18: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de limo (2-63 µm).	83
Figura 19: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de arena (63-2000 µm).	84



Figura 20: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable densidad aparente.....	85
Figura 21: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable densidad real.....	86
Figura 22: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable porosidad.....	87
Figura 23: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable humedad.....	88
Figura 24: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable saturación de agua.....	89
Figura 25: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable conductividad eléctrica.....	90
Figura 26: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable pH.....	91
Figura 27: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable materia orgánica del suelo.....	92
Figura 28: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable carbono orgánico del suelo.....	93
Figura 29: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas.....	94
Figura 30: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas.....	95
Figura 31: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable riqueza en comunidades fúngicas.....	96
Figura 32: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable riqueza en comunidades bacterianas.....	97
Figura 33: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable Equitatividad en comunidades fúngicas.....	98
Figura 34: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable Equitatividad en comunidades bacterianas.....	99
Figura 35: Correlaciones positivas significativas entre el índice de Shannon Weaver (H) con el pH, para ambas comunidades microbianas (Bacterias y hongos).....	102
Figura 36: Correlaciones positivas significativas entre la Riqueza (S) con el pH, para ambas comunidades microbianas (Bacterias y hongos).....	103
Figura 37: Correlaciones negativas significativas entre la Equitatividad para las comunidades fúngicas con la porosidad del suelo y el contenido de arena.....	103

ÍNDICE DE ANEXOS

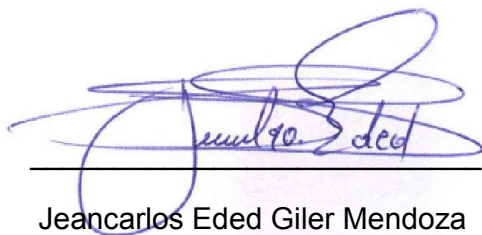
Anexo 1: encuesta al encargado o propietario del cultivo sobre la prácticas culturales aplicadas durante el ciclo actual, historia de cultivo y descripción de la fisiografía del sitio y características del suelo.	77
Anexo 2: sitios de muestreo, realización de encuesta y recolección de muestras.	79
Anexo 3: preparación de muestras para los análisis físico-químicos, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente (sin exponer la muestra al sol).	79
Anexo 4: preparación de muestras para la extracción de ADN metagenómico.	80
Anexo 5: Diagrama de Flujo del protocolo de extracción para el ADN ambiental (metagenoma) de las muestras de suelo usando el kit Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU).	80
Anexo 6: Equipos utilizados en el laboratorio de Biología Molecular.	81
Anexo 7: Análisis descriptivo de las variables estudiadas	82
Anexo 8: Condiciones óptimas de DGGE para el ARNr 16S; imagen visualizada y fotografiada en un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.	100
Anexo 9: Condiciones óptimas de DGGE para la Región ITS; imagen visualizada y fotografiada en un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.	101
Anexo 10: Correlación de Rho de Spearman y Pearson entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.	101



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Jeancarlos Eded Giler Mendoza, autor de la tesis **“Caracterización de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Enero del 2017



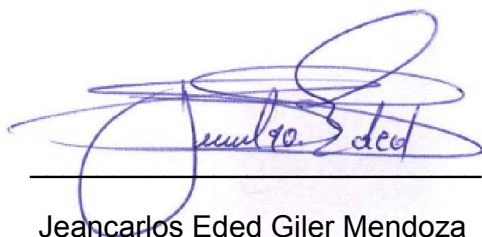
C.I: 0604433169



DERECHOS DE AUTOR

Yo Jeancarlos Eded Giler Mendoza, autor de la tesis **“Caracterización de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Agrónomo. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, Enero del 2017



Jeancarlos Eded Giler Mendoza

C.I: 0604433169



Cuenca, 18 de enero de 2017

Dr. Guillermo Serpa

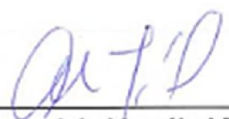
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DE LA
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Su despacho

Quienes conformamos el tribunal de sustentación de la tesis cuyo título es **"Caracterización de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional"** de autoría del Sr. Egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica: Jeancarlos Eded Giler Mendoza, **CERTIFICAMOS** que el referido egresado ha realizado los cambios sugeridos a su trabajo de tesis, por lo tanto solicitamos por su intermedio al H. Consejo Directivo se proceda a fijar la fecha de sustentación y defensa del referido trabajo de tesis.

Particular que informamos a su persona para los fines pertinentes, agradeciendo de antemano su atención.

Atentamente


Ing. Eduardo Chica Ph. D
PRESIDENTE DE TRIBUNAL
Blgo. Andrés Yarzabal Ph. D
MIEMBRO DE TRIBUNAL
Ing. Patricio Castro Ph. D
MIEMBRO DE TRIBUNAL



Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres Eded y Lorena. A papá por siempre motivarme a estudiar y enseñarme que en la vida las cosas se las gana a base esfuerzo, trabajo duro y honesto. Y a mamá por el apoyo incondicional aunque a la distancia siempre se preocupó por mí.

A mi hijo Jhosué Emiliano, quien es mi motor y por el cual doy todo en la vida.

A mi esposa Verónica, que durante el tiempo que estamos juntos fue un apoyo incondicional.

A mis hermanos, Ángel y Lorena, que a pesar de estar lejos siempre supe que podía contar con ellos.

A mi familia entera, tanto de abuelos como de tíos, primos que siempre me brindaron su apoyo.

Jeancarlos Giler



Agradecimientos

A Dios, por darme fortaleza y guiarme siempre por buen camino.

A mis padres y esposa, quienes han sido un apoyo fundamental en mi carrera.

Mis gratos agradecimientos a la Universidad de Cuenca por recibirme durante todos estos años de aprendizaje.

A mi director de tesis Dr. Fernando Bermúdez, por dedicar su tiempo y contribuir con sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

A mi co-director de tesis Dr. Andrés Yarzábal, por dedicar su tiempo, brindar sus conocimientos y sobre todo por su apoyo, paciencia y consejos.

Al Dr. Eduardo Chica, por brindarme su apoyo y tiempo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Ángel Javier Aguirre de Juana, por dedicar su tiempo y contribuir con sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

A los docentes de la Universidad de Cuenca por trabajar constantemente para formar profesionales capacitados y con valores.

A la Asociación de Pequeños Productores del Guabo, por facilitar la recolección de muestras de suelo en fincas bananeras.

A mis amigos, compañeros quienes estuvieron presentes durante todo este tiempo de vida universitaria.

Jeancarlos Giler

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son esenciales para el funcionamiento y la sostenibilidad de todos los ecosistemas naturales, uno de estos ecosistemas es el suelo, un hábitat complejo y heterogéneo donde existe una gran diversidad de microorganismos (Kozdrój y van Elsas 2000, Prosser 2002).

Dentro del sistema suelo podemos distinguir el entorno inmediato de la raíz de la planta, es decir, la rizósfera, la cual es considerada como uno de los puntos más densamente poblados y dinámicos en el suelo (Mendes et al. 2014). Las comunidades microbianas en la rizósfera constituyen parte de la red alimentaria que utiliza los nutrientes liberados por la planta, que son los que regulan indirectamente la diversidad microbiana y la actividad en las inmediaciones de las raíces de las plantas (Mendes et al. 2013, 2014).

La diversidad microbiana en el suelo generalmente se evalúa a nivel de especies o como diversidad genética y muy pocas veces se toma en cuenta la diversidad estructural y funcional; no obstante, estas dos últimas medidas de la diversidad pueden ser más relevantes para la salud del suelo (van Bruggen y Semenov 2000). Así, por ejemplo, suelos sometidos a manejo orgánico tienen mejor calidad y actividad microbiana (Mulder et al. 2003, van Diepeningen et al. 2006, Nautiyal et al. 2010), esto debido a la rotación de cultivos y la reducción de aplicación de nutrientes y pesticidas sintéticos al suelo (Wu et al. 2008). Por el contrario se ha demostrado que el manejo convencional tiende a alterar las propiedades del suelo y la diversidad funcional de las comunidades microbianas (Islam et al. 2009, Chaudhry et al. 2012).

Sin embargo, esta diversidad está probablemente subestimada debido a que la mayoría de estudios realizados hasta ahora se han basado en métodos tradicionales que suponen el cultivo de los microorganismos en distintos tipos de medios agarizados, lo cual permite caracterizar tan solo una pequeña fracción de las comunidades microbianas que colonizan el suelo (Kozdrój y van Elsas 2000, Prosser 2002). Además, los métodos tradicionales no permiten estudiar los efectos causados por el manejo y la producción de los cultivos, sobre las interacciones entre miembros de las comunidades microbianas (Nannipieri et al. 2003, Mendes et al. 2014).

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la extracción, la amplificación y el análisis del ADN genómico o metagenómico (incluyendo su secuenciación) ha facilitado la caracterización de las comunidades microbianas complejas (Roesch et al. 2007, Duarte et al. 2012). Por ejemplo, la técnica DGGE permite determinar la diversidad y la estructura de comunidades microbianas presentes en un determinado ambiente en un lapso de pocas horas y a un costo bastante inferior al de otras técnicas (Duarte et al. 2012, Cornejo Romero et al. 2014).

Actualmente, existen pocos estudios donde se comparen las características de las comunidades microbianas, en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo alternativos: orgánico y convencional (Rossmann et al. 2012, Shen et al. 2013, 2014, 2015). En Ecuador, la mayoría de los trabajos desarrollados en microbiología de suelos asociados al cultivo de banano han estudiado grupos específicos de microorganismos, usando métodos clásicos de estudio, con las limitaciones ya mencionadas. Por ejemplo, existen reportes sobre el uso de *Trichoderma harzianum* para el control de *Radopholus similis* (Triviño 2003), y otros sobre el efecto de hongos Micorrízicos Arbusculares y la fertilización, sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de banano (Tufiño et al. 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental para el crecimiento vegetal, la fertilidad y la estructura del suelo. Existen factores bióticos o abióticos que conducen a la alteración de la estructura y composición microbiana que pueden influir directa o indirectamente al suelo, la actividad del ciclo de nutrientes y la producción de cultivos (Zak et al. 2003, Nautiyal et al. 2010). Entre estos factores las prácticas de manejo como la siembra directa, el uso de pesticidas, la labranza mecanizada, la aplicación repetida de los abonos, etc producen un efecto directo sobre la microbiota del suelo (Feng et al. 2003).

Para comprender y aprovechar los efectos favorables de ciertos grupos de microorganismos del suelo es necesario primero identificarlos (Daniel 2004); sin embargo, a pesar de las funciones claves que cumplen algunos de estos microorganismos en la salud del suelo, se conoce muy poco acerca de los cambios que



sufre la composición de las comunidades microbianas y las actividades que estas cumplen después de la implementación de diversas enmiendas orgánicas o convencionales (Mazzola 2004, Shen et al. 2014).

La composición de las comunidades microbianas del suelo y los cambios inducidos causados por su modificación, proporcionan información útil sobre la salud y calidad del suelo (van Bruggen y Semenov 2000, Poulsen et al. 2013). Por ejemplo, (Shen et al. 2013) identificaron un incremento en la población bacteriana y de actinomicetos en un suelo enmendado con un biofertilizante; dicho incremento es particularmente importante porque las comunidades bacterianas son componentes principales que determinan la salud del suelo, además de ser uno de los principales impulsores para el control de enfermedades (Garbeva et al. 2004). Por lo tanto el mantener la diversidad y la composición microbiana es muy importante para la producción agrícola sostenible (Islam et al. 2009, Chaudhry et al. 2012).

En virtud de las variadas contribuciones a la función del ecosistema del suelo por parte de las comunidades microbianas, se ha planteado esta investigación en la que proponemos usar la técnica de DGGE para caracterizar la estructura y diversidad de las mismas, en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico. La selección de esta herramienta molecular permitirá analizar comunidades biológicas complejas, con mayor resolución y eficiencia que los métodos tradicionales (Griffiths et al. 2000, Mazzola 2004, Mocali y Benedetti 2010).

La importancia de caracterizar a las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo convencional y orgánico tiene una repercusión a nivel regional, al ser el uno de los cultivos con mayor superficie sembrada en el país y debido a su gran importancia económica. El estudio de las características de las comunidades de microorganismos, además de las propiedades físico-químicas en este tipo de suelos, contribuirá además de diseñar recomendaciones de manejo integral de la nutrición edáfica y biocontrol de plagas y enfermedades.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Caracterizar la estructura, riqueza y diversidad de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) presentes en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar las características físicas en suelos cultivados con banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.
- Determinar índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) que colonizan suelos cultivados con banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.
- Comparar los índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional?

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Importancia de las comunidades microbianas para la producción agrícola

5.1.1 Reciclaje de nutrientes

El crecimiento óptimo de las plantas requiere del suministro de nutrientes (nitrógeno fijo, hierro y fósforo). Muchos suelos agrícolas carecen de una cantidad suficiente de uno o más de estos compuestos. Para evitar este problema y obtener mayores rendimientos en los cultivos los agricultores se han vuelto cada vez más dependientes de las fuentes químicas de nitrógeno y fósforo. Además de ser costosa, la producción de fertilizantes químicos agota los recursos no renovables, el petróleo y el gas natural

utilizados para producir estos fertilizantes, y plantea riesgos humanos y ambientales, sería obviamente ventajoso si se pudieran utilizar medios biológicos eficientes para proporcionar nitrógeno y fósforo a las plantas, para sustituir por lo menos una porción del nitrógeno y fósforo químicos que se usan actualmente (Glick 2012).

Es crucial adoptar intervenciones agrobiotecnológicas adecuadas para el uso racional y prudente de los recursos de la tierra para maximizar la producción de alimentos, con este fin los “microorganismos promotores del crecimiento vegetal” (PGPMs), podrían cumplir un rol importante en la agricultura sostenible, ya que son socios microbianos rizosféricos conocidos por las plantas y su aplicación ayuda no sólo a aumentar la fertilidad del suelo, la producción agrícola y la calidad alimentaria y nutricional sino también a mejorar los agroecosistemas (Sarma et al. 2015). En cuanto al reciclaje de nutrientes los PGPMs contribuyen a mejorar de la absorción de estos, con la ayuda de fijadores N_2 , solubilizantes fosfato, productores de sideróforos, etc (Sarma et al. 2015). Además los PGPMs también son útiles para la prevención de la desnutrición en los cultivos mediante el aumento del contenido mineral de los productos agrícolas (es decir, la biofortificación de Fe, Zn y Se). Por lo tanto, la utilización de los PGPMs pueden influir en la disponibilidad de micronutrientes por solubilización, la quelación, y las reacciones de oxidación / reducción en el suelo (Adak et al. 2016).

Existen una serie de bacterias libres capaces de fijar nitrógeno y proporcionarlo a las plantas, por ejemplo, *Azospirillum* spp. y *Rhizobia* spp.; sin embargo, se cree generalmente que las bacterias libres proporcionan sólo una pequeña cantidad de nitrógeno fijo que la planta hospedadora requiere (Bashan y Levanony 1990, Glick 2012). Los fijadores de nitrógeno también incluyen fijadores simbióticos de nitrógeno como *Rhizobium* spp. La inoculación de *Rhizobium* spp.; provoca un mayor incremento en el crecimiento y rendimiento de la planta, además del incremento del número de nódulos por sistema radicular en plantas inoculadas con *Rhizobium* spp.; en comparación con plantas sin *Rhizobium* spp.; bajo condiciones de campo (Akhtar y Siddiqui 2009).

En cuanto a los fosfatos, se sabe que la cantidad presente en el suelo es generalmente bastante alta (entre 400 y 1.200 mg kg⁻¹ de suelo); sin embargo la mayor parte de este fósforo es insoluble y por lo tanto el fósforo inorgánico no está disponible para apoyar el crecimiento de la planta. Por lo tanto, la solubilización y mineralización del fósforo orgánico por las bacterias solubilizantes de fosfato es un rasgo importante en las “bacterias que promueven el crecimiento de las plantas” (PGPB), así como en hongos promotores del crecimiento de plantas tales como los hongos micorrícicos (Richardson 2001).

En cuanto al hierro, a pesar de que es el cuarto elemento más abundante en la tierra, en los suelos aerobios, el hierro no es fácilmente asimilable por las bacterias o las plantas porque el ion férrico o Fe⁺³ que precipita e interactúa con aniones, forma complejos insolubles, por lo tanto la cantidad de hierro disponible para la asimilación por los organismos vivos es extremadamente baja (Ma 2005). Tanto los microorganismos como las plantas requieren un alto nivel de hierro y obtener suficiente hierro es aún más problemático en la rizosfera, porque las bacterias y los hongos compiten por el hierro. La provisión de hierro a las plantas por las bacterias del suelo es aún más importante cuando las plantas están expuestas a un estrés ambiental como la contaminación por metales pesados. En este caso, ciertos sideróforos ayudan a aliviar las tensiones impuestas a las plantas por los altos niveles de metales pesados en el suelo (Glick 2012).

5.1.2 Producción de fitohormonas

Las hormonas vegetales, también conocidas como fitohormonas, son mensajeros químicos que influyen en la capacidad de la planta para reaccionar en su ambiente (Vejan et al. 2016). Estos son compuestos orgánicos naturales que son eficaces a muy baja concentración y son en su mayoría sintetizados en ciertas partes de la planta y transportados a otro lugar. Tomando en cuenta que las fitohormonas influyen en los procesos fisiológicos a bajas concentraciones, los procesos influenciados incluyen: crecimiento, diferenciación, desarrollo y otros procesos como el movimiento estomático también podrían verse afectados (Vejan et al. 2016). También es importante señalar que cada respuesta de la planta es a menudo el resultado de dos o más hormonas que actúan juntas (Porcel et al. 2014).

Existen ciertas “bacterias que promueven el crecimiento vegetal” (PGPR) capaces de producir fitohormonas y metabolitos secundarios (Porcel et al. 2014) implicados en la regulación y desarrollo de las raíces de la planta como: la auxina producida por **PGPR** como por ejemplo: *Bacillus megaterium* o *Pseudomonas* spp (Babalola 2010), citoquinina, etileno, giberelinas en menor medida, y el ácido abscísico (ABA) (Moubayidin et al. 2009, Stepanova y Alonso 2009, Dodd et al. 2010).

5.1.3 Antagonismo o inhibición de patógenos

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas o inhibidores de patógenos, entre ellos bacterias, levaduras y hongos, estos antagonistas tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre patógenos de interés (Siddiqui 2005). En este sub-capítulo trataremos sobre los PGPR. El potencial de las PGPR como biocontroladores proviene de varios mecanismos, desde el antagonismo bacteriano a la producción de antibióticos, sideróforos o mejorando la salud y el sistema defensivo de la planta por medio de hormonas vegetales, existen determinadas PGPR puede proteger e inmunizar a muchas plantas frente a un amplio rango de patógenos y problemas abióticos, como por ejemplo: bacterias metanógenas que son capaces de suprimir a los nematodos que destruyen cultivos, hasta PGPR productoras de compuestos volátiles biocidas como el DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol), HCN (ácido cianhídrico) 2,3-butanediol o la acetoina, que además de tener actividad fungicida pueden mejorar el crecimiento de algunas plantas (Babalola 2010).

5.2 Impactos antrópicos sobre las comunidades microbianas en el sector agrícola

En las últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos para aumentar la productividad agrícola mediante el aumento de la fertilización y aplicación de pesticidas, riego mejorado, regímenes de manejo de suelos y cultivos, y las conversiones masivas de tierras (Tilman et al. 2002). Sin embargo la intensificación agrícola está poniendo una enorme presión sobre la capacidad del suelo para mantener sus funciones que llevan a la degradación de los ecosistemas a gran escala y la pérdida de la productividad en el largo plazo (Trivedi et al. 2016).



Los impactos antrópicos agrícolas surgen en gran parte de la necesidad de cumplir demandas de una población cada vez mayor en términos de alimentos, fibra y combustible (Tilman et al. 2002), estos impactos influyen en los microorganismos del suelo, cambiando la cantidad y calidad de los residuos vegetales que entran en el suelo y su distribución espacial, a través de cambios en la nutrición edáfica (Christensen 1996).

Se sabe que los cultivos reducen generalmente la cantidad de materia orgánica del suelo reduciendo así la disponibilidad de nutrientes; del mismo modo, los cambios en el uso del suelo alteran tanto la estructura de la comunidad microbiana como su diversidad en los ecosistemas terrestres (Rodrigues et al. 2013). En algunos casos, los cambios en las poblaciones o la actividad microbiana puede preceder a cambios detectables en las propiedades físicas y químicas del suelo, proporcionando de este modo una señal temprana de mejorar el suelo o una advertencia temprana de la degradación del suelo (Trivedi et al. 2016).

Consecuentemente, las prácticas de manejo tienen un efecto directo sobre la microbiota del suelo; así por ejemplo, suelos sometidos a la perturbación por la labranza pueden ser más susceptibles a la reducción de la microbiota del suelo debido a la desecación, la destrucción mecánica, la compactación del suelo, reducción de porosidad, y la interrupción del acceso al recurso alimenticio (Giller 1996), mientras que, suelos sometidos a la siembra directa de cultivos extensivos pueden aumentar la biomasa microbiana (Feng et al. 2003). Además, la incorporación de algunos fertilizantes orgánicos, como el estiércol, promueven la actividad microbiana del suelo. Sin embargo, la aplicación repetida de los abonos puede representar peligros para el medio ambiente, ya que introducen flora microbiana fecal en el suelo y tiene el potencial de alterar la estructura microbiana endógena (Soupir et al. 2006). Del mismo modo el uso excesivo de pesticidas puede modificar drásticamente la función y estructura de las comunidades microbianas del suelo, alterando así el normal funcionamiento de los ecosistemas terrestres, que a su vez tiene implicaciones importantes para la calidad del suelo (Pampulha y Oliveira 2006).

5.3 Métodos de estudio de las comunidades microbianas

5.3.1 Técnicas tradicionales

5.3.1.1 Recuento en placas

Tradicionalmente, la diversidad microbiana se evaluó utilizando distintos tipos de medios agarizados y recuentos viables directos. Esta técnica de bajo costo permite caracterizar una pequeña fracción de todos los microorganismos (los denominados cultivables), presentes en un determinado ambiente en un lapso de pocas horas; además proporciona información del componente heterotrófico activo de la población (Tabacchioni et al. 2000). Las limitaciones de estas técnicas para el estudio de las comunidades microbianas incluyen la dificultad para separar bacterias o esporas alojadas en las partículas del suelo, selección del medio de crecimiento, condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz), e incapacidad para cultivar un gran número de especies bacterianas y fúngicas, debido a que no conocemos los requerimientos nutricionales y las condiciones a las cuales crecen de la gran mayoría de ellos. Además, el crecimiento en placas favorece a los microorganismos con tasas de crecimiento rápido y aquellos hongos que producen un gran número de esporas. Todas estas limitaciones influyen en la subestimación de la diversidad de los microorganismos estudiados por este tipo de estrategias (Trevors 1998, Tabacchioni et al. 2000).

5.3.1.2 Perfil fisiológico a nivel comunitario para medir diversidad la microbiana (CLPP)

Llamado también perfil metabólico de la capacidad de la comunidad bacteriana o fúngica de utilizar fuentes de carbono específicas CLPPS, es una técnica que puede revelar diferencias entre comunidades microbianas, es relativamente barata, muy reproducible y genera una gran cantidad de datos que reflejan las características de las comunidades estudiadas (Zak et al. 1994). Sus limitaciones contemplan: solo puede ser usada para microorganismos cultivables capaces de crecer bajo condiciones experimentales, favorece a los microorganismos de crecimiento rápido, es sensible a la densidad del inóculo y refleja la diversidad metabólica potencial, y no diversidad existente *in situ*. Además, las fuentes de carbono pueden no ser representativas de aquellas presentes en el suelo y, por lo tanto, la utilidad de la

información puede ser cuestionada. No obstante, CLPP es útil cuando se estudia la diversidad funcional de los suelos y es una valiosa herramienta especialmente cuando se utiliza junto a otros métodos (Garland y Mills 1991, Yao et al. 2000).

5.3.1.3 Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

Esta técnica no se basa en el cultivo de microorganismos, y proporciona información sobre la composición de la comunidad microbiana basada en agrupaciones de ácidos grasos (Ibekwe y Kennedy 1998). Los ácidos grasos constituyen una proporción relativamente constante de la biomasa celular y existen ácidos grasos que pueden diferenciar grupos taxonómicos importantes dentro de una comunidad (Bossio et al. 1998). Por lo tanto, un cambio en el perfil de ácidos grasos representaría un cambio en la población microbiana. Para el análisis FAME, los ácidos grasos se extraen directamente del suelo, se metilan y se analizan por cromatografía de gases. Los perfiles FAME de diferentes suelos pueden compararse mediante análisis multivariante, este método detectará cambios en la composición de la comunidad bacteriana y / o fúngica. Se ha utilizado para estudiar la composición de las comunidades microbianas y los cambios de población debido a las prácticas agrícolas (Ibekwe y Kennedy 1998, 1999).

5.3.2 Técnicas moleculares

Para estudiar la diversidad microbiana, las técnicas dependientes del ADN recombinante permiten superar la limitación de no poder cultivar la mayoría de los microorganismos de un ambiente particular. Con ellas es posible el aislamiento, la modificación y la caracterización del ADN de cualquier organismo. Estas técnicas son fundamentales para el estudio de la diversidad biológica (Torsvik et al. 2002), a continuación se describen algunas de estas técnicas:

5.3.2.1 Contenido de guanina más citosina (G + C)

Las diferencias en el contenido de ADN de guanina más citosina (G + C) pueden usarse para estudiar la diversidad bacteriana de las comunidades de suelo (Nüsslein y Tiedje 1999). Se basa en el conocimiento de que los microorganismos difieren en su contenido de G + C y que los grupos taxonómicamente relacionados sólo difieren entre

el 3% y el 5% (Tiedje et al. 1999). Este método proporciona un nivel de resolución aproximado, ya que diferentes grupos taxonómicos pueden compartir el mismo rango de G + C. Las ventajas del análisis de G + C, son que no está influenciada por sesgos de PCR, incluye todo el ADN extraído, es cuantitativa y puede descubrir miembros raros en las poblaciones microbianas. Sin embargo, requiere grandes cantidades de ADN (hasta 50 µg) (Tiedje et al. 1999).

5.3.2.2 Reasociación e hibridación de ácidos nucleicos

La reasociación del ADN es una medida de la complejidad genética de la comunidad microbiana y se ha utilizado para estimar la diversidad (Torsvik et al. 1990, 1996). El ADN total se extrae de muestras ambientales, se purifica, se desnaturaliza y se deja hibridar. La tasa de hibridación o reasociación dependerá de la similitud de las secuencias presentes, a medida que aumenta la complejidad o diversidad de las secuencias de ADN, la velocidad a la que se hibrida el ADN disminuirá (Theron y Cloete 2000).

Bajo condiciones específicas, el tiempo necesario para la reasociación de la mitad del ADN puede utilizarse como un índice de diversidad, ya que tiene en cuenta tanto la cantidad como la distribución de la reasociación del ADN (Torsvik et al. 1998). Alternativamente, se puede estudiar la similitud entre comunidades de dos muestras diferentes midiendo el grado de similitud del ADN a través de la cinética de hibridación (Griffiths et al. 1999).

5.3.2.3 Enfoques basados en el empleo de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener múltiples de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Cornejo Romero et al. 2014). Inicialmente, las técnicas moleculares para estudios ecológicos se basaron en la clonación de genes aislados de muestras ambientales (Muyzer y Smalla 1998), aunque la secuenciación se ha vuelto rutinaria. Por lo tanto, se han desarrollado

muchas otras técnicas para evaluar la diversidad de comunidades microbianas. En estos métodos, el ADN se extrae de la muestra ambiental y se purifica. El ADN blanco (16S, 18S o ITS) se amplifica utilizando cebadores universales o específicos y los productos resultantes se separan de diferentes maneras (Kirk et al. 2004). Sin embargo al momento de la amplificación existe el riesgo de la aparición de artefactos, dando como resultado bandas fantasmas o heterodúplex (Myers et al. 1989). Para disminuir sesgos durante la PCR la touchdown (TD)-PCR ofrece un medio simple y rápido para optimizar los PCR, aumentando la especificidad, la sensibilidad y el rendimiento, sin necesidad de optimizaciones largas y / o el rediseño de los cebadores. La touchdown PCR emplea una temperatura de hibridación inicial por encima de la temperatura de fusión proyectada (T_m) de los cebadores que se utilizan, y luego transita progresivamente a una temperatura de hibridación más baja y más permisiva durante el transcurso de ciclos sucesivos. La touchdown PCR ha encontrado amplia aplicabilidad en protocolos de PCR estándar y el procedimiento toma entre 90 y 120 min, dependiendo de la longitud de la plantilla (Korbie y Mattick 2008).

5.3.2.4 Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) / análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

El polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), también conocido como análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), es otra herramienta utilizada para estudiar la diversidad microbiana (Liu et al. 1997), basada en la existencia de polimorfismos de ADN. El ADNr amplificado por PCR se digiere con una enzima de restricción, la cual da origen a fragmentos de diferentes longitudes que se detectan usando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante o en agarosa. Los patrones de bandas de RFLP pueden usarse para medir la estructura de la comunidad bacteriana (Liu et al. 1997, Tiedje et al. 1999). Este método es útil para detectar cambios estructurales en comunidades microbianas, pero no como una medida de diversidad o detección de grupos filogenéticos específicos. Sin embargo los patrones de bandas en comunidades diversas se vuelven demasiado complejos para analizarlos por RFLP ya que una sola especie podría tener de cuatro a seis fragmentos de restricción (Liu et al. 1997, Tiedje et al. 1999).



5.3.2.5 Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal (T-RFLP)

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) es una técnica que supera algunas de las limitaciones de RFLP. Sigue el mismo principio que RFLP excepto que uno de los cebadores está marcado con un colorante fluorescente, tal como: TET (4, 7, 2', 7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína) o 6-FAM (Fosforamidita fluorocromo 5-carboxifluoresceína). Esto permite la detección de sólo el fragmento de restricción terminal marcado; además simplifica el patrón de bandas, permitiendo así el análisis de comunidades complejas, así como proporcionando información sobre la diversidad ya que cada banda visible representa una sola unidad taxonómica operacional. El patrón de bandas puede usarse para medir la riqueza y uniformidad de las especies, así como las similitudes entre las muestras. Esta técnica está limitada no sólo por la extracción de ADN y sesgos de la PCR, sino también por la elección de cebadores universales. Ninguno de los cebadores universales actualmente disponibles puede amplificar todas las secuencias de los dominios eucariota, bacteriano y arcaico. Además, estos cebadores se basan en las bases de datos 16S rRNA, 18S rRNA o ITS existentes, que hasta hace poco contenían principalmente secuencias de microorganismos cultivables, y por lo tanto la verdadera diversidad microbiana en una muestra puede no ser representativa (Liu et al. 1997, Tiedje et al. 1999).

5.3.2.6 Análisis de espacios intergénicos ribosómicos (RISA) / Análisis de espacios intergénicos ribosómicos automatizado (ARISA)

Similar principio a RFLP y T-RFLP, en RISA y ARISA, la región intergénica (IGS) presente entre los genes que codifican las subunidades ribosómicas 16S y 23S se amplifica por PCR, se desnaturalizan y se separan en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Esta región puede codificar ARNt y es útil para diferenciar cepas bacterianas y especies estrechamente relacionadas debido a la heterogeneidad de la longitud y a la secuencia de la IGS. En RISA, los polimorfismos de la secuencia se detectan usando tinción de plata mientras que en ARISA el cebador se marca fluorescentemente y se detecta automáticamente. Ambos métodos proporcionan perfiles de comunidades bacterianas altamente reproducibles, pero RISA requiere grandes cantidades de ADN, y tarda más, la tinción con plata es algo



insensible y la resolución tiende a ser baja. ARISA aumenta la sensibilidad del método y reduce el tiempo, pero sigue sujeto a las limitaciones tradicionales de PCR (Fisher y Triplett 1999). RISA se ha utilizado para comparar la diversidad microbiana en el suelo, en la rizosfera de plantas (Borneman y Triplett 1997) y en suelos contaminados (Ranjard et al. 2000).

5.3.2.7 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) / electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE)

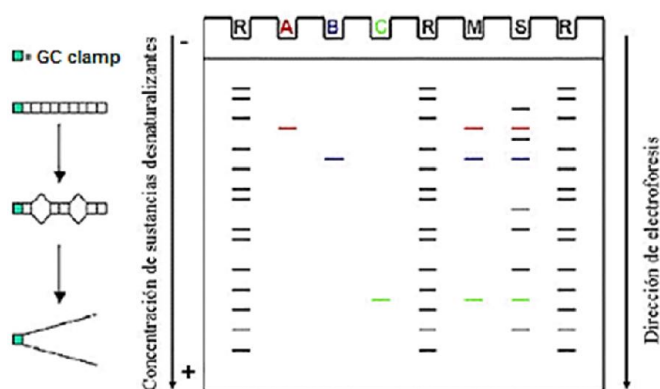
La electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) son dos métodos similares para estudiar la diversidad microbiana. Estas técnicas se desarrollaron originalmente para detectar mutaciones puntuales en secuencias de ADN. Muyzer et al. (1993) amplió el uso de DGGE para estudiar la diversidad genética microbiana. El ADN se extrae de muestras de suelo y se amplifica usando PCR con cebadores universales. El producto amplificado es separado en un gel de poliacrilamida con un gradiente de concentración creciente de desnaturalizantes (formamida y urea) (Muyzer et al. 1993).

Teóricamente, la DGGE puede separar el ADN con una diferencia de un par de bases (Miller et al. 1999). TGGE utiliza el mismo principio que el DGGE, excepto que el gradiente es la temperatura en lugar de los desnaturalizantes químicos. DGGE / TGGE se ha utilizado para evaluar la diversidad de bacterias y hongos en la rizosfera causada por cambios antropogénicos (Kirk et al. 2004).

Se han desarrollado una serie de enfoques para estudiar la diversidad microbiana a nivel molecular. En este estudio nos hemos propuesto usar la técnica basada en PCR, como es la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). A continuación se presentan los fundamentos teóricos, limitaciones y aplicaciones de la técnica en detalle.

5.4 Fundamentos de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

La técnica fue diseñada originalmente por Fischer y Lerman (1979) y desarrollada por Muyzer et al. (1993). La DGGE (del inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) es una técnica molecular que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia nucleotídica. La separación se basa en la disminución de la movilidad electroforética de una molécula de ADN parcialmente fundida, en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes de ADN (una mezcla de urea y formamida). Los fragmentos de ADN pobres en guanina-citosina (microorganismo A) (Figura 1) se desnaturalizan a bajas concentraciones de urea y formamida, por lo que su migración en el gel se interrumpe rápidamente y ocupan posiciones superiores; ocurre lo contrario con los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina (microorganismo C) (Figura 1), cuya migración por el gel sólo se retarda a altas concentraciones de urea y formamida, ocupando posiciones inferiores (Muyzer y Smalla 1998).



R: Perfil de referencia; A: Microorganismo 1; B: Microorganismo 2; C: Microorganismo 3; M: Mezcla de los microorganismos 1, 2 y 3; S: Muestra desconocida

Figura 1: Principio de la DGGE; Fuente: (Cornejo Romero et al. 2014).

En la DGGE, la resolución óptima se consigue cuando las moléculas de ADN se desnaturalizan por completo. La amplificación por PCR de los fragmentos a analizar requiere del uso de iniciadores modificados con la “grapa GC”, que evita que las cadenas de ADN se separen por completo (Figura 1). Esta grapa es una secuencia de 30-50 pares de bases de guanina-citosina, que se añade al extremo 5’ de uno de los iniciadores (Myers et al. 1987).



El ambiente desnaturalizante en la DGGE es garantizado por las siguientes condiciones: 1) sometiendo a las moléculas de ADN a una temperatura constante dentro del rango de 50-65 °C. Esta temperatura fue elegida empíricamente para exceder la temperatura media de fusión (T_m) de un fragmento de ADN rico en adenina-timina en ausencia de agentes químicos desnaturalizantes (Muyzer y Smalla 1998) y 2) la presencia de agentes desnaturalizantes (urea y formamida) que desnaturalizan el ADN al formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas impiden el apareamiento normal de las mismas (Cornejo Romero et al. 2014).

5.5 Aplicaciones de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) en el campo de la microbiología del suelo

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas, como consecuencia del uso de métodos moleculares, como la DGGE, y otras técnicas antes descritas, que no requieren del cultivo de microorganismos para detectarlos e identificarlos (Torsvik et al. 2002).

Así, la DGGE ha proporcionado información valiosa en el estudio de comunidades microbianas en ambientes complejos como suelos, lagos, lodos activados, biorreactores, alimentos o tracto gastrointestinal (Cornejo Romero et al. 2014). Al respecto, se han publicado interesantes trabajos de investigación. Por ejemplo, Shen et al. (2013) investigaron los efectos de diferentes compost y bio-fertilizante orgánico aplicado en un huerto re-plantado de banano, establecido por más de 10 años sobre la incidencia de la marchitez en banano por *Fusarium* y el rendimiento del cultivo, y calidad de la cosecha en una temporada de crecimiento. van Diepeningen et al. (2006) evaluaron los efectos del manejo orgánico versus manejo convencional y los parámetros químicos y biológicos en suelos agrícolas. Dilly et al. (2004) mostraron que la diversidad bacteriana en suelos fertilizados con residuos agrícolas de origen vegetal (biofertilizantes), depende tanto del tipo de residuo como del tipo de suelo, clima, vegetación y microflora autóctona presente. En Argentina, Vega Avila et al. (2015) investigaron las diferencias en las comunidades microbianas de la rizosfera de la vid, bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

5.6 Ventajas y Desventajas del uso de la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para la caracterización de comunidades microbianas

Debe enfatizarse que como cualquier método, las técnicas moleculares no están libres de errores y sesgos, que pueden ser introducidos por manipulación o por la complejidad de las muestras. Consideremos que el primer paso en la caracterización molecular de las comunidades microbianas es la extracción de ácidos nucleicos de las células presentes en las muestras; este paso tampoco está libre de sesgos. Por ejemplo, problemas con la lisis fiable y reproducible de todas las células bacterianas, así como con la extracción de ácido nucleico intacto y la eliminación de sustancias tales como ácidos húmicos y exopolisacáridos que pueden inhibir la digestión del ADN con enzimas de restricción y amplificación por PCR, y de igual modo puede resultar para las células fúngicas (Muyzer y Smalla 1998).

La principal desventaja que posee la técnica DGGE, es la limitante en el número de pares de bases que puede analizar (500 pb), por lo que se requiere un trabajo previo de optimización con el uso de cebadores para evitar la presencia de bandas heterodúplex (Neilson et al. 2013). La presencia de éstas bandas, puede deberse a la PCR, ya que es una fuente importante de errores y sesgos. (Neilson et al. 2013).

Los problemas asociados al uso de la PCR dan lugar a la formación de las llamadas moléculas quiméricas (Muyzer y Smalla 1998). Las quimeras son productos híbridos compuestos de secuencias parentales distintas que pueden conducir a la mala interpretación de las estimaciones de diversidad, se ha demostrado que la formación de quimeras suele ser más alta en muestras genéticamente más diversas (Fonseca et al. 2012). Además, la formación de moléculas heterodúplex durante el proceso de amplificación podría contribuir a las dificultades en la interpretación de la complejidad de la comunidad a partir de los patrones de DGGE (Myers et al. 1989).

Una molécula de ADN heterodúplex tiene hebras de dos productos de PCR diferentes, los cuales pueden formarse por re-hibridación de productos de PCR desnaturalizados. Debido a los desajustes entre las cadenas dobles en las moléculas heterodúplex la temperatura de fusión es menor que para las moléculas homoduplex. El principal problema de las moléculas heterodúplex en un análisis por DGGE es que puede

sobreestimar el número real de constituyentes comunitarios (Muyzer y Smalla 1998). Sin embargo (Murray et al. 1996) concluyeron que la formación de moléculas heterodúplex en el análisis PCR-DGGE de poblaciones microbianas mixtas no es un problema significativo. Cuando las moléculas heterodúplex son evidenciadas, entonces la formación relativa de ADN heterodúplex en la PCR puede reducirse usando una fuerza iónica más alta, concentraciones de cebador altas y una temperatura de fusión más baja, así como disminuyendo el número de ciclos de amplificación (Muyzer y Smalla 1998, Neilson et al. 2013).

Se estima que poblaciones que representen menos del 1 %, en una muestra ambiental no se pueden detectar con el uso de esta técnica. Además, fragmentos de ADN de diferentes secuencias pueden tener características de movilidad similares en el gel de poliacrilamida. Por lo tanto, una banda puede no necesariamente representar una especie; alternativamente una especie bacteriana también puede dar lugar a múltiples bandas debido a múltiples genes 16S rRNA con secuencias ligeramente diferentes (Kirk et al. 2004).

En cuanto a sus ventajas la DGGE es un método altamente sensible y relativamente reproducible, permite analizar simultáneamente numerosas muestras así como evaluar las diferencias y similitudes que pudieran existir entre ellas. Es ideal para realizar estudios preliminares de diversidad microbiana ya que permite comparar comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes sitios en ecosistemas similares y además permite comparar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales. Uno de los principales factores por la cual la hace una técnica muy utilizada en estudios y caracterización de comunidades microbianas es que hace posible la detección e identificación de microorganismos no cultivables (Cornejo Romero et al. 2014).

Además, esta técnica presenta grandes ventajas tanto en su equipamiento, tiempo, costos y resultados. Sin embargo ha habido un debate considerable acerca de los tiempos de funcionamiento y tensiones adecuadas. En general, a mayor tiempo de corrida electroforética, y con tensiones inferiores, los geles tienden a ser de mejor calidad. Los voltajes están en el rango de 50 – 250 V, y los tiempos de ejecución son generalmente de 3 horas a 17 horas. Un tiempo de ejecución estándar de 17 horas

(esencialmente durante la noche) a 100 V produce geles de alta calidad para muchos fragmentos de PCR (Green et al. 2009). Finalmente, cabe destacar que durante su ejecución no se utilizan reactivos extremadamente tóxicos o mutagénicos por lo que los cuidados en el laboratorio deben ser los básicos (Neilson et al. 2013).

5.7 Índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (UTOs)

5.7.1 Índice de Shannon Weaver

$$H = - \sum p_i \ln p_i$$

Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una muestra. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran 1988).

5.7.2 Medición de la riqueza específica

La riqueza específica (S) es la forma más sencilla de medir la biodiversidad, ya que se basa únicamente en el número de especies presentes, sin tomar en cuenta el valor de importancia de las mismas. La forma ideal de medir la riqueza específica es contar con un inventario completo que nos permita conocer el número total de especies (S) obtenido por un censo de la comunidad. La mayoría de las veces tenemos que recurrir a índices de riqueza específica obtenidos a partir de un muestreo de la comunidad (Moreno 2001).

5.7.3 Índice de Equitatividad de Pielou

$$E_H = \frac{H}{H_{\max}}$$

Donde: $H_{\max} = \ln S$

Mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor va de 0 a 1,0 de forma que 1.0 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes (Magurran 1988).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El área de estudio está ubicada en dos cantones pertenecientes a la región 6 y 7: cantón Camilo Ponce Enríquez, Provincia del Azuay y cantón El Guabo, Provincia de El Oro. En las siguientes coordenadas:

Tabla 1: Coordenadas de Ubicación de los sitios de muestreo.

Manejo	Cantón	Pares de muestreo	N° muestra	Coordenadas UTM	Altitud (m.s.n.m)
ORGANICO	Camilo Ponce Enríquez	A	1036	654305 N; 9670893 E	329,0
CONVENCIONAL	Camilo Ponce Enríquez	A'	1037	651120 N; 9686130 E	67,3
ORGANICO	El Guabo	B	1038	623424 N; 9644575 E	12,1
CONVENCIONAL	El Guabo	B'	1039	624062 N; 9644289 E	10,5
ORGANICO	El Guabo	C	1040	625351 N; 9652013 E	28,3
CONVENCIONAL	El Guabo	C'	1041	627170 N; 9653077 E	9,6
ORGANICO	El Guabo	D	1042	631781 N; 9651327 E	9,6
CONVENCIONAL	El Guabo	D'	1043	631621 N; 9647447 E	6,5
ORGANICO	El Guabo	E	1044	631791 N; 9643419 E	23,8
CONVENCIONAL	El Guabo	E'	1045	631103 N; 9642080 E	7,8

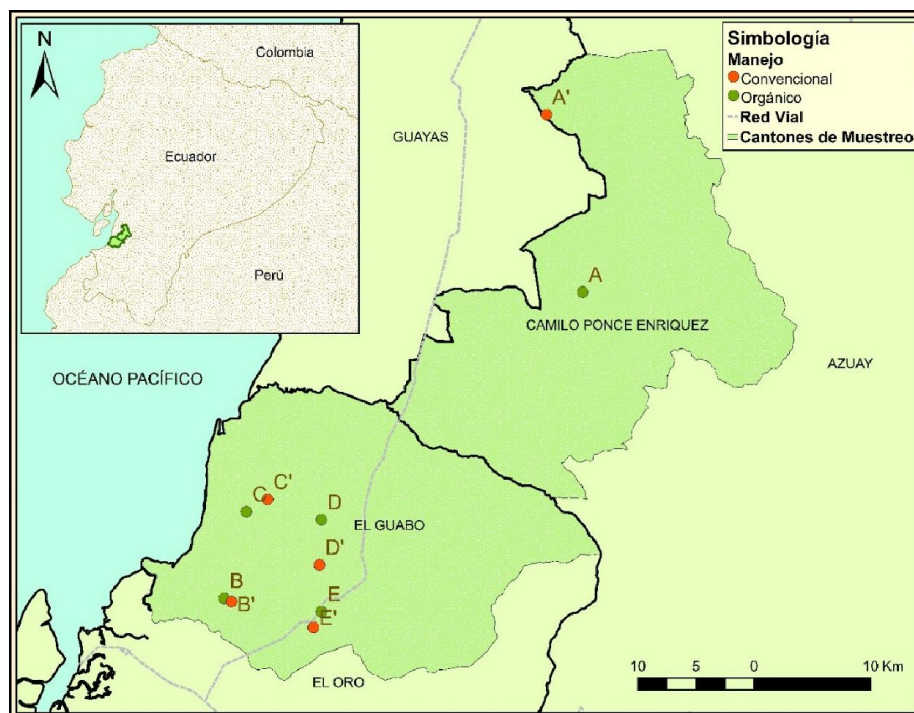


Figura 2: Ubicación a nivel continental, provincial y cantonal del área de estudio; Fuente: SNI

6.2 Área de ejecución del proyecto

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Biología Molecular y Química e Hidro-física de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, durante los meses de Junio a Noviembre del 2016.

6.3 Selección de sitios de estudio, caracterización cultural y recolección de muestras

Se seleccionaron 5 pares de parcelas de muestreo correspondientes al cultivo de banano bajo manejo orgánico o convencional. Los pares muestreados fueron georeferenciados, y tomando en cuenta criterios de selección, estos sitios de muestreo fueron seleccionados lo más cercanamente posible el uno del otro para minimizar variaciones ambientales y edáficas.

El día del muestreo en cada sitio se realizó: a) una solicitud de colecta de muestras de suelo en medios privados, b) una encuesta al encargado o propietario del cultivo sobre la prácticas culturales aplicadas durante el ciclo actual y la historia de cultivo y c) una descripción de la fisiografía del sitio y características del suelo (Anexo 1).

La recolección de muestras para el análisis metagenómico consistió en: para cada sitio de muestreo se colectaron tres submuestras de suelo rizosférico; estas submuestras fueron tomadas de una sola planta, formando un triángulo en los 10 cm más superficiales del suelo, utilizando una pala esterilizada *in situ*. Luego estas tres submuestras fueron posteriormente mezcladas para formar una sola muestra compuesta de aproximadamente 200 g de suelo por cada sitio de estudio. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron cuidadosamente pasadas por un tamiz esterilizado de 2 mm para eliminar piedras y residuos del cultivo. Finalmente fueron conservadas en viales a - 20°C hasta que se realizó la extracción de ADN metagenómico de las mismas.

La recolección de muestras para análisis físicos y químicos consistió en: para cada sitio de muestreo se colectaron aproximadamente 2 kg de suelo distribuidos de forma aleatoria en el terreno utilizando una pala esterilizada *in situ*. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron cuidadosamente pasadas por un tamiz de 2 mm para eliminar piedras y residuos del cultivo. Finalmente fueron secadas a temperatura ambiente para su posterior análisis.

6.4 Caracterización físico-química

En las muestras colectadas para análisis físicos se determinó: textura, clase textural, densidad aparente, densidad real, porosidad, contenido de humedad, porcentaje de saturación de agua (ver más abajo).

En las muestras colectadas para análisis químicos se determinó: conductividad eléctrica, pH, materia orgánica y contenido de carbono orgánico (ver más abajo).

6.4.1 Análisis Físicos

6.4.1.1 Análisis de textura; método del hidrómetro Eijkelkamp y Clase textural

20 g de suelo (<2 mm) se diluyeron en 20 ml de agente dispersante (Hexametáfosfato de sodio ((NaPO_3)₆) al 4%) más agua destilada hasta completar un volumen aproximado de 400 ml. Para la separación de la fracción de arena se filtró la solución a través de un tamiz de 63 μm , posteriormente la fracción de arena obtenida fue secada en un recipiente a 105 °C por 24 horas. Para la determinación de las fracciones de limo y arcilla la suspensión <63 μm fue vertida en un cilindro y aforada con agua destilada hasta completar un volumen de 1000 ml. Para obtener el blanco **R (bl)** se diluyeron 20 ml de agente dispersante y se aforó con agua destilada hasta completar un volumen de 1000 ml, posteriormente la suspensión se equilibró térmicamente a una temperatura constante de 20 °C en el cilindro de sedimentación. A continuación se tapó el cilindro de sedimentación con un tapón y se agitó, tan pronto como se mezcló, cuidadosamente se bajó el hidrómetro en la suspensión y se tomó la lectura **R** cuando éste estuvo estable (pero no más tarde que 50 segundos después de completada la mezcla). Terminada la primera lectura se reinsertó el hidrómetro cuidadosamente cerca de 10 segundos antes de cada lectura. Los tiempos de lectura fueron: 0,83, 5, 120, 960 y 1440 minutos (Bouyoucos 1962).

Nota: Se recomienda sacar el hidrómetro y limpiarlo luego de cada lectura y anotar la lectura **R** cada vez que se introduzca el hidrómetro e introducir el hidrómetro en el blanco, y anotar la lectura como **R (bl)**.

**Cálculos:**

1. La concentración de sedimentos en suspensión **C**, en g/L es:

$$C = R - R(bl)$$

Donde:

R: Lectura en la solución sin corregir, g/L

R (bl): Lectura en el blanco, g/L

2. El porcentaje de partículas **P** para un intervalo de tiempo, es decir el porcentaje del peso de todas las partículas todavía presentes en la profundidad de medida después de un tiempo de sedimentación, es

$$P = 100 * \frac{C}{C_0}$$

Donde:

C₀: Peso total de la muestra

C₀ = C_{50s} + Peso total de la fracción de arena

C_{50s}: Peso de las fracciones de arena y arcilla

3. El diámetro promedio de partículas **X**, en μm se obtiene usando:

$$X = \frac{1000\sqrt{Bh'}}{\sqrt{t}}$$

Donde:

El factor **B** ($\times 10^{-4}$) en función de la temperatura a 20 °C

$$B = 1,85$$

$$h' = -0,164 R + 16,3$$

h': Profundidad efectiva del hidrómetro, cm

t: Tiempo en minutos

4. Usando las lecturas con el hidrómetro y la información del tamice, grafique **P** vs. **X**. De la curva resultante, determine los porcentajes de arcilla y limo. El porcentaje de arena se obtendrá por substracción. Una vez conocidos los porcentajes de arena, arcilla y limo, se puede ir al triángulo de texturas y caracterizar el suelo.

6.4.1.2 Análisis de Densidad aparente (*da*); método del cilindro

Para este método se utilizó un muestreador Eijkelkamp, con el cual colectamos un volumen de 98,2 cm³ de suelo. Posteriormente los cilindros fueron llevados al laboratorio para su secado en la estufa (105 °C por 24 horas) y pesado para determinar su masa (Blake y Hartge 1986).

Para el análisis de densidad aparente se trabajó en función de la fórmula:

$$da = \frac{\text{peso seco del suelo}}{\text{volumen del cilindro}}$$

6.4.1.3 Análisis de densidad real (d_r); método del Picnómetro

Por medio de la balanza se realizaron las siguientes pesadas: 1) Peso del sólido: **M1**; 2) Peso del picnómetro lleno de agua destilada: **M2**; 3) Peso del picnómetro con agua destilada y el sólido: **M3**. Al realizar las pesadas con el picnómetro se llenó de agua destilada hasta la señal de enrase, si ésta es sobrepasada se introduce un palillo hecho con papel de filtro para absorber el líquido sobrante. Hay que procurar secar el picnómetro por fuera, con un paño o papel de filtro (Blake y Hartge 1986).

$$d_r = \frac{M}{V} \quad V = \frac{M1 + M2 - M3}{d}$$

d : densidad del agua = 1g/cm³; entonces:

$$d_r = \frac{M1}{M1 + M2 - M3}$$

6.4.1.4 Análisis de porosidad (%P)

Para el análisis de la porosidad se trabajó en función de la fórmula:

$$\%P = 1 - \frac{da}{d_r}$$

(Klute et al. 1986).

6.4.1.5 Análisis del contenido de humedad; método volumétrico

La masa de cada muestra fue determinada antes y después de la eliminación del agua, la eliminación de agua consistió en secar la muestra en la estufa a 105 °C por 48 horas (Gardner 1986).

Para el análisis del contenido de humedad se trabajó en función de la fórmula:

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{\text{peso del suelo húmedo} - \text{peso del suelo}}{\text{peso del suelo seco}} \times da$$

6.4.1.6 Análisis de retención de agua; método volumétrico

La masa se determinó primero con la muestras saturadas durante 72 horas y después con la eliminación del agua, la eliminación de agua consistió en secar la muestra en la estufa a 105 °C por 48 horas (Klute 1986).

Para el análisis de la capacidad de retención de humedad se trabajó en función de la fórmula:

$$\text{Retención de humedad} = \frac{\text{peso del suelo saturado} - \text{peso del suelo}}{\text{peso del suelo seco}} \times da$$



6.4.2 Análisis químicos

6.4.2.1 Análisis de conductividad eléctrica

En 50 ml de agua destilada se añadió 10 g de suelo secado temperatura ambiente (sin exponer la muestra al sol), la mezcla se homogenizó con ayuda de un magneto durante un tiempo de 20 minutos. En un embudo, en el que previamente se colocó un papel filtro se vertió la suspensión de suelo y se obtuvo un líquido filtrado para el análisis, a esta suspensión se le sumergió el electrodo del conductímetro para obtener la lectura del valor de la conductividad eléctrica (C.E.).

Para este procedimiento se trabajó una relación 1:5 en relación peso/volumen.

10 g de suelo : 50 ml de agua destilada

(Rhoades 1996).

6.4.2.2 Análisis de pH

En 50 ml de agua destilada se añadió 20 g de suelo secado temperatura ambiente (sin exponer la muestra al sol), la mezcla se homogenizó con ayuda de un magneto durante un tiempo de 20 minutos. En un embudo, en el que previamente se colocó un papel filtro se vertió la suspensión de suelo y se obtuvo un líquido filtrado para el análisis, a esta solución se le sumergió el electrodo del potenciómetro para obtener la lectura del valor del pH.

Para este procedimiento se trabajó una relación 1:2,5 en relación peso/volumen.

20 g de suelo : 50 ml de agua destilada

(Sparks et al. 1996).

6.4.2.3 Análisis de materia orgánica del suelo

Los contenidos de materia orgánica del suelo (M.OS.) se realizaron mediante el método de ignición. 10 g de cada muestra y se colocaron en un crisol, previamente pesado y fueron secadas en la estufa a 105° C por 24 horas. Secadas las muestras, se pesaron y fueron ingresadas a la mufla a una temperatura de 400 °C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo necesario las muestras fueron enfriadas en un desecador, para evitar que entren en contacto con la humedad ambiental, una vez enfriadas fueron pesadas. Para la determinación del porcentaje de materia orgánica

se registraron los pesos de la muestra con el contenido mineral y el peso de la incineración. La diferencia de estos pesos es el resultado del contenido de materia orgánica (Magdoff et al. 1996).

6.4.2.4 Análisis de Carbono orgánico del suelo

Para el análisis de carbono orgánico del suelo (C.O.S) se trabajó en función de la fórmula:

$$M.O.S. = C.O.S * 1,724$$

(Allison 1965).

6.5 Extracción de ADN

El ADN ambiental (metagenoma) de las muestras de suelo colectadas fue extraído usando el kit Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver Anexo 5). Para verificar la extracción y el estado de ADN metagenómico, alícuotas de cada muestra fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñidas con SybrGreen y visualizadas en un transiluminador UV (E-Gel® Imager System), posteriormente las muestras fueron almacenadas en tubos de 2 ml a -20°C .

6.6 Amplificación por PCR

6.6.1 Amplificación por *touchdown* PCR para la región ITS

Para amplificar la región ITS se aplicó un método de PCR anidado en dos etapas: la primera etapa consistió en un *touchdown* PCR (TD-ITS) utilizando los cebadores universales ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5-'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Liu et al. 2015).

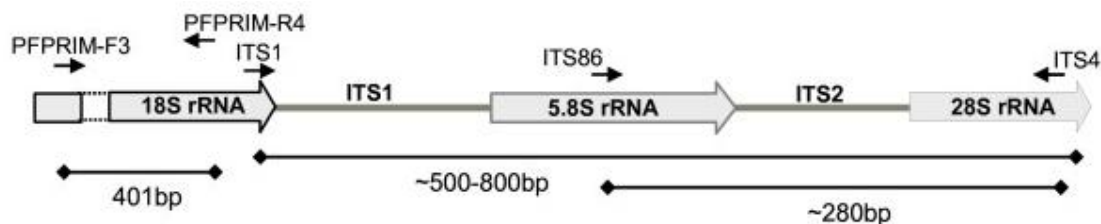


Figura 3: Representación esquemática del gen ribosomal ARNr 18S y la región ITS; Fuente: Embong et al. (2008).

La touchdown PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, en un volumen final de 20 μ L compuesta por agua destilada ultra pura más los siguientes reactivos:

Tabla 2: Concentraciones de los reactivos utilizados en la touchdown PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Cebador A	0,2 μ M
Cebador B	0,2 μ M
Taq DNA Polymerase	1 unidad
ADN metagenómico	1 μ L

El perfil térmico empleado fue el descrito por Liu et al. (2015): una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de desnaturalización (*touchdown*) a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos con una disminución en la temperatura de hibridación 1°C por cada ciclo, seguido por 25 ciclos de hibridación a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 7 minutos. Además se incluyó para cada reacción de PCR un control negativo, el cual consistía en colocar la reacción sin ADN blanco.

A partir de las muestras correspondientes a los amplicones ITS1F/ITS4 se realizó la segunda etapa, que consistió en una PCR anidada utilizando los cebadores ITS1FGC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCTTGGTCATTTAGAGGAACTAA-3') e ITS2 (5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3') (Liu et al. 2015). Una cola GC fue añadida al cebador ITS1F respectivamente, para evitar la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.

La PCR anidada se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, en un volumen final de 50 μ L compuesta por compuesta por agua destilada ultra pura más los siguientes reactivos:

Tabla 3: Concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR anidada.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Cebador A	0,2 μ M
Cebador B	0,2 μ M
Taq DNA Polymerase	1,5 unidades
Amplicón ITS1F/ITS4 diluido 1:100	1 μ L

El perfil térmico empleado fue el descrito por Wu et al. (2013): una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de hibridación a 94°C por 45 segundos, 55°C por 75 segundos y 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos. Además se incluyó para cada reacción de PCR un control negativo, el cual consistía en colocar la reacción sin ADN blanco.

Para verificar la amplificación, alícuotas de cada muestra fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñidas con SybrGreen y visualizadas en un transiluminador UV (E-Gel® Imager System). Se utilizó una mezcla de 5 µL de marcador de longitud o escalera (100 - 12000 pb) + 0,5 µL de SYBR Green para verificar el tamaño del producto amplificado. La corrida electroforética se efectuó a 80 voltios por 30 minutos y posteriormente los productos amplificados fueron almacenados en tubos de 2 ml a – 20 °C.

6.6.2 Amplificación por *touchdown* PCR para ARNr 16S

Para amplificar el gen que codifica el ARNr 16S se aplicó un *touchdown* PCR (TD-16S) utilizando los cebadores universales F968-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCAACGCGAAGAACTTAC-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Brons y Van Elsas 2008). Una cola GC fue añadida al cebador F968 respectivamente, para evitar la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.

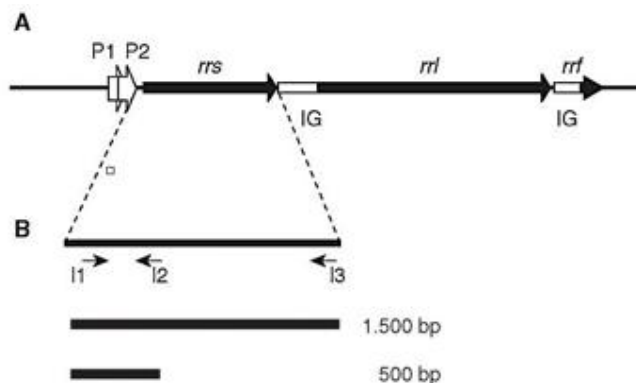


Figura 4: Representación esquemática del operón (*rrn*), donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*); Fuente: Rodicio y Mendoza (2004).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, en un volumen final de 50 μL compuesta por compuesta por agua destilada ultra pura más los siguientes reactivos:

Tabla 4: Concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
45 μL de Platinum® PCR SuperMix	1 X
Cebador A	0,2 μM
Cebador B	0,2 μM
ADN metagenómico	1 μL

El perfil térmico empleado fue el descrito por (Brons y Van Elsas 2008): una desnaturalización inicial durante 5 min a 94 ° C; seguido por 10 ciclos de desnaturalización (*touchdown*) de 1 min a 94 ° C, 1 min a 65 ° C y 2 min a 72 ° C con una disminución en la temperatura de hibridación de 1 ° C por ciclo; seguido por 25 ciclos de hibridación de 1 min a 94 ° C, 1 min a 55 ° C y 2 min a 72 ° C; seguido de una extensión final de 30 min a 72 ° C. Además se incluyó para cada reacción de PCR un control negativo, el cual consistía en colocar la reacción sin ADN blanco.

Para verificar la amplificación, alícuotas de cada muestra fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñidas con SybrGreen y visualizadas en un transiluminador UV (E-Gel® Imager System). Se utilizó una mezcla de 5 μL de marcador de longitud o escalera (100 - 12000 pb) + 0,5 μL de SYBR Green para verificar el tamaño del producto amplificado. La corrida electroforética se efectuó a 80 voltios por 30 minutos y posteriormente los productos amplificados fueron almacenados en tubos de 2 ml a – 20 °C.

6.7 Parámetros de DGGE para el ARNr 16S

Para determinar las condiciones óptimas de separación mediante la técnica de DGGE para el ARNr 16S procedimos de la siguiente manera: la polimerización se inició con persulfato de amonio (APS) al 9 % (v/v) y 1 μL TEMED por cada 10 ml de solución. En el primer ensayo se utilizó poliacrilamida [6% (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1)] en un tampón TAE 0,5 \times . Las soluciones contenían un rango desnaturalizante de 30% a 80% [100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v/v) de formamida ultrapura].

En los siguientes ensayos se modificaron varias cosas como: la polimerización se realizó con TEMED relación 1:1 y persulfato de amonio (APS) al 10% (v/v) relación 1:6, se utilizó poliacrilamida [7 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1)] en un tampón TAE 0,5×. Las soluciones contenían un rango desnaturalizante de 40% a 70%, 30% a 60%, 30% a 55% y las condiciones óptimas una amplitud de rango desnaturalizante de 35% a 55% [100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v/v) de formamida ultrapura]. Además en cada gel se incluyó un “tapón” de acrilamida al 7% sin desnaturalizante en la parte inferior del sándwich de vidrio para evitar flujos y un stacking en la parte superior a la misma concentración de acrilamida sin desnaturalizante.

Para cargar las muestras en los geles se utilizó una mezcla de 3 µl de BlueJuice 10× + 15µl de producto amplificado, el marcador utilizado fue una muestra correspondiente a azucena convencional (muestra 1035). La corrida electroforética se realizó en un tampón TAE 0,5×, durante los 10 primeros minutos a 100 V a 60 °C (corrida de prueba) y posteriormente a 80 V a 60 °C. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 14 horas, a la mañana siguiente se tiñeron con una solución de SYBR Green 2× diluida en un tampón TAE 0,5× durante 30 min, y las imágenes se visualizaron y se fotografiaron con un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.

6.8 Parámetros de DGGE para la región ITS

Para determinar las condiciones óptimas de separación mediante la técnica de DGGE para la región ITS se trabajó en similares condiciones a las establecidas para el ARNr 16S. A excepción de las condiciones de la polimerización, se modificaron varias cosas como: se utilizó poliacrilamida [8 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1)] en un tampón TAE 0,5×, con un rango desnaturalizante de 30% a 50%, 25% a 40% y las condiciones óptimas una amplitud de rango desnaturalizante de 20% a 35% [100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v/v) de formamida ultrapura], la optimización se basó según el protocolo descrito por (Wu et al. 2013). Además en cada gel se incluyó un “tapón” de acrilamida al 8% sin desnaturalizante en la parte inferior del sándwich de vidrio para evitar flujos y un stacking en la parte superior a la misma concentración de acrilamida sin desnaturalizante.

Para cargar las muestras en los geles se utilizó una mezcla de 3 μ l de BlueJuice 10 \times + 15 μ l de producto amplificado, el marcador utilizado fue una muestra correspondiente a lechuga convencional (muestra 1020). La corrida electroforética se realizó en un tampón TAE 0,5 \times , durante los 10 primeros minutos a 100 V a 60 °C (corrida de prueba) y posteriormente a 80 V a 60 °C. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 14 horas, a la mañana siguiente se tiñeron con una solución de SYBR Green 2 \times diluida en un tampón TAE 0,5 \times durante 30 min, y las imágenes se visualizaron y se fotografiaron con un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.

6.9 Análisis de datos

A partir de los perfiles generados por DGGE, se determinaron los siguientes índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (UTOs): riqueza, índice de Shannon e índice de Equitatividad. Para ello se utilizó el software Gel Analyzer. Posteriormente, a partir de los resultados de todos los sitios muestreados se compararon las estructuras de las comunidades de bacterias y hongos usando diferentes análisis jerárquicos mediante los algoritmos UPGMA, WPGMA, Neighbour Joining, Single Linkage y Complete Linkage. Para ello se utilizó el software PyElph (versión 1.4).

Para determinar el índice de Shannon-Weaver (**H**) se utilizaron los valores de “RAW volumen” calculados en el software “Gel Analyzer”, posteriormente se obtuvo el valor de la abundancia relativa (p_i) que corresponde a la intensidad de una banda en específico. Finalmente se aplicó la fórmula $[H = - \sum p_i \ln p_i]$ para cada una de las bandas en cada carril y la sumatoria de todas las intensidades determinó el valor final del índice de Shannon-Weaver (**H**). De este modo, el número de bandas por carril corresponde a la riqueza (**S**). Y para determinar el índice de Equitatividad (**E_H**) se utilizó la fórmula $[E_H = H / \ln (S)]$.

Para cumplir con los tres supuestos básicos: Normalidad, independencia y homogeneidad de varianza, se realizó un análisis descriptivo para cada variable estudiadas (Anexo 7): textura, clase textural, densidad aparente, densidad real, porosidad, porcentaje de humedad, porcentaje de saturación de agua, conductividad



eléctrica, pH, materia orgánica, contenido de carbono orgánico, riqueza, índice de Shannon e índice de Equitatividad (variables dependientes). Para ello se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22. Para probar si las variables tienen una distribución normal, se realizó el test de Shapiro-Wilks. Resultando que 13 variables cumplían con este supuesto. Para una mejor interpretación se realizaron histogramas y gráficos de caja que permiten observar la distribución.

Para contrastar las diferencias entre las características físico-químicas del suelo, riqueza e índices de diversidad respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional (manejo: variables independientes), se fundamentó en una prueba t ($p < 0,05$) para muestras independientes y la prueba U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para los datos no paramétricos (Tabla 8).

Además se investigaron las relaciones entre las variables con un test de correlación paramétrico de R de Pearson ($p < 0,05$) para las variables que cumplían con los tres supuestos básicos y las variables que no cumplían con los supuestos se analizaron mediante un test de correlación no paramétrico de Rho de Spearman ($p < 0,05$) (Anexo 10). Las variables de estudio utilizadas para los análisis fueron: características físico-químicas del suelo y los índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (UTOs). Para una mejor interpretación se realizaron gráficos de regresión lineal del para explicar el comportamiento de las variables relacionadas.



7. RESULTADOS

De acuerdo a lo planteado en el objetivo 1, en la Tabla 5 se indican los valores de las características físicas y químicas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional. Los resultados correspondientes a porcentajes están expresados en tanto por unidad.

7.1 Análisis físico-químicos

Tabla 5: Características físico-químicas en suelos cultivados con banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

Manejo	Código campo	Densidad aparente	Densidad real	% Porosidad	pH	C.E.	%M.O.S.	%C.O.S.	%Humedad	%Saturación de agua	%Arcilla < 2µm	%Limo 2-63µm	%Arena 632000µm	Clase Textural
Orgánico	1036	0,48	2,20	0,7858	5,90	0,51	0,1990	0,1154	0,5575	0,6900	0,0785	0,0746	0,8469	Franco arenoso
Orgánico	1038	0,90	2,50	0,5120	6,39	0,17	0,0290	0,0168	0,3413	0,4400	0,2074	0,2670	0,5256	Franco arcilloso arenoso
Orgánico	1040	1,11	2,20	0,6416	4,98	0,13	0,0680	0,0394	0,3240	0,4870	0,1819	0,2580	0,5601	Franco arenoso
Orgánico	1042	0,96	2,20	0,5932	6,27	0,25	0,0480	0,0278	0,2210	0,4250	0,2306	0,3574	0,4120	Franco
Orgánico	1044	0,97	2,20	0,5014	6,26	0,57	0,0570	0,0331	0,2870	0,4180	0,2375	0,4305	0,3320	Franco
Convencional	1037	1,22	2,50	0,6202	6,44	0,12	0,0710	0,0412	0,2000	0,5170	0,0505	0,0812	0,8683	Franco arenoso
Convencional	1039	1,02	2,50	0,5702	6,81	0,36	0,0990	0,0574	0,4180	0,5410	0,2063	0,2612	0,5324	Franco arcilloso arenoso
Convencional	1041	0,84	2,20	0,5783	6,79	0,43	0,0580	0,0336	0,3490	0,4760	0,1789	0,2374	0,5837	Franco arenoso
Convencional	1043	0,94	2,20	0,5621	4,47	0,73	0,0940	0,0545	0,4040	0,5040	0,2616	0,5647	0,1737	Franco limoso
Convencional	1045	1,02	2,20	0,5401	6,98	0,34	0,0860	0,0499	0,4120	0,5030	0,3876	0,1785	0,4339	Franco arcilloso

C.E.: Conductividad Eléctrica; M.O.S.: Materia orgánica del suelo; C.O.S.: Carbono orgánico del suelo.

Los resultados de las características físicas y químicas en los suelos estudiados evidencian que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla 8). Sin embargo se puede destacar que la muestra 1036 correspondiente al manejo orgánico presenta un valor alto de materia orgánica (19%), el cual influye en la porosidad, densidad aparente, carbono orgánico, contenido y retención de humedad.

7.2 Extracción del ADN metagenómico

En la Figura 5, se presenta un gel de agarosa que muestra bandas correspondientes a la extracción del ADN metagenómico (5 μ l de cada muestra) y la escalera o marcador de longitud (100-12000 pb) confirma que el tamaño aproximado es superior a 12000 pares de bases. Además se puede observar que el ADN se encuentra integro con presencia de bandas discretas intensas, lo que indica que el ADN extraído es de buena calidad. No obstante la concentración e intensidad de ADN de las muestras 1041, 1042 y 1044 es superior a lo observado en las muestras 1037, 1038 y 1039.

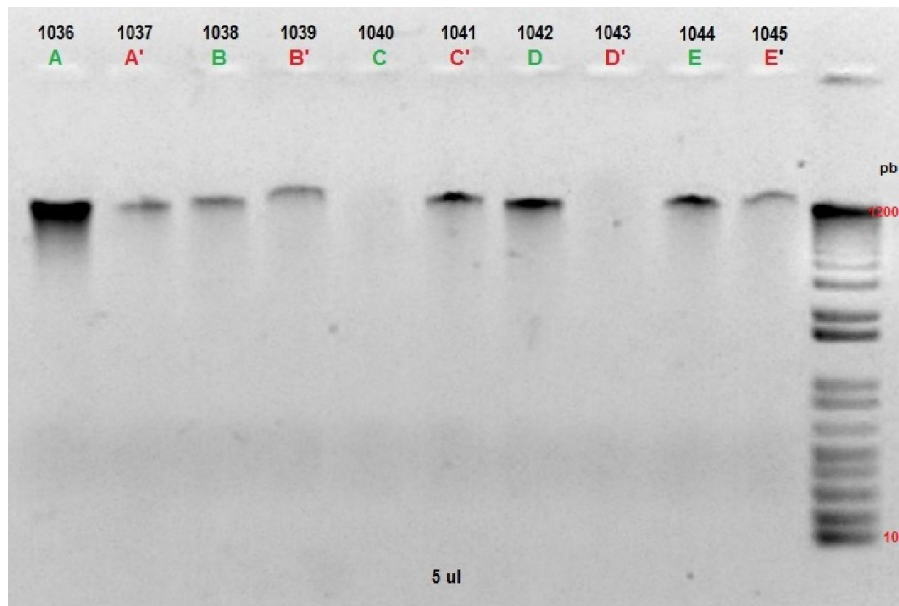


Figura 5: Alícuotas de la extracción de ADN metagenómico sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v.

Debido a que en la primera extracción no se observaron bandas en las muestras 1040 y 1043, se realizó una segunda extracción, y para su comprobación 10 μ l de cada muestra fueron sometidas a electroforesis, a excepción de la muestra

1036 de la cual solo de cargo en el gel 5 μ l. Con esto se consiguió una banda tenue, que indica la existencia de ADN metagenómico en las muestras 1040 y 1043 (Figura 6).

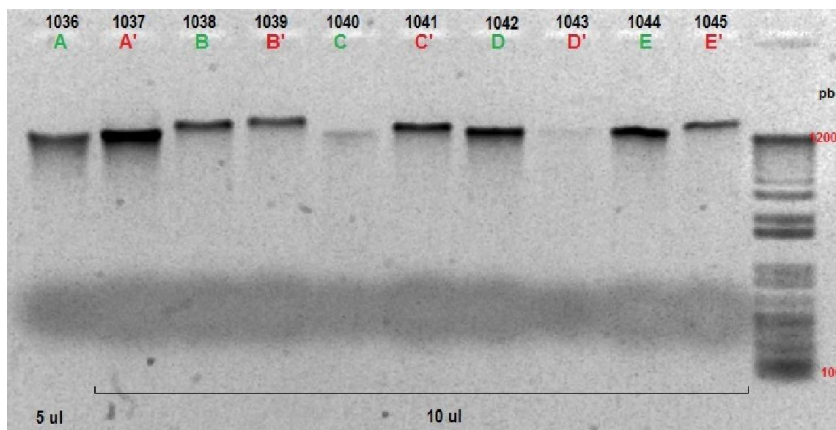


Figura 6: Alícuotas de la segunda extracción de ADN metagenómico de las muestras 1040 y 1043, sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v.

Como se puede observar en los resultados de la figura 6 el ADN se encuentra íntegro con presencia de bandas discretas intensas, lo que indica que el ADN extraído es de buena calidad. Sin embargo nuevamente se presentaron problemas de extracción en las muestras 1040 y 1043, las bandas obtenidas son muy tenues a diferencia de las demás muestras, donde la concentración e intensidad de ADN es mayoritariamente homogénea.

El material producto de la extracción de ADN de todas las muestras fue conservado en viales a -20°C , al cabo de tres meses se realizó una verificación de la integridad y estabilidad del material genético durante su almacenamiento, los resultados mostraron que el material se conservó adecuadamente.

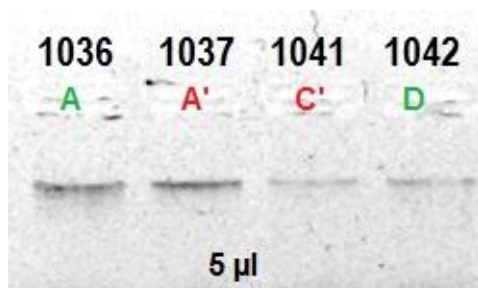


Figura 7: Verificación de la integridad y estabilidad del material genético al cabo de tres meses de almacenamiento a -20°C .

7.3 Amplificación por *touchdown* PCR para la región ITS

La amplificación por *touchdown* PCR (primera etapa) para la región ITS fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa. En la Figura 8, se presenta un gel de agarosa que muestra bandas correspondientes a los fragmentos amplificados con los cebadores ITS1F-ITS4 (5 µl de cada muestra) y la escalera o marcador de longitud (100-12000 pb) muestra el tamaño del producto amplificado esperado entre 500-650 pb aproximadamente. Las muestras 1038, 1040, 1042, 1043, 1045 indican o sugieren que hubo una amplificación muy poco eficiente y en las otras aunque hubo muy buena amplificación se observa la presencia de una doble banda como es el caso de las muestras 1036, 1037 y 1039.

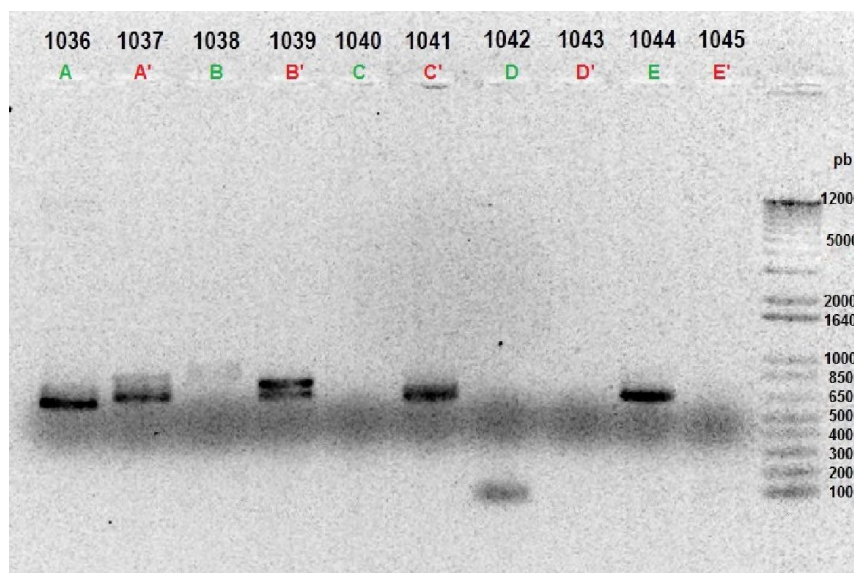


Figura 8: Amplificación por TD-PCR de la región ITS con los cebadores ITS1F-ITS4 sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 500-650 pb aproximadamente.

A partir de las muestras correspondientes a los amplicones ITS1F/ITS4 se realizó una PCR anidada (segunda etapa), usando 1 µL de ADN diluido a una concentración de 1:100 v/v., a excepción de las muestras en las que no hubo amplificación, las cuales no fueron diluidas (sd). En la PCR anidada se utilizaron los cebadores ITS1FGC-ITS2. En la figura 9, se presenta un gel de agarosa que muestra bandas correspondientes a los fragmentos amplificados con los cebadores ITS1FGC-ITS2 (5 µl de cada muestra) y la escalera o marcador de longitud (100-12000 pb) muestra el tamaño del producto amplificado esperado

entre 300-400 pb aproximadamente. Al contrario de la touchdown PCR, en la PCR anidada se obtuvo amplificación en todas las muestras. No obstante aunque hubo una muy buena amplificación se observa la presencia de una doble banda con evidencia de degradación en algunas muestras.

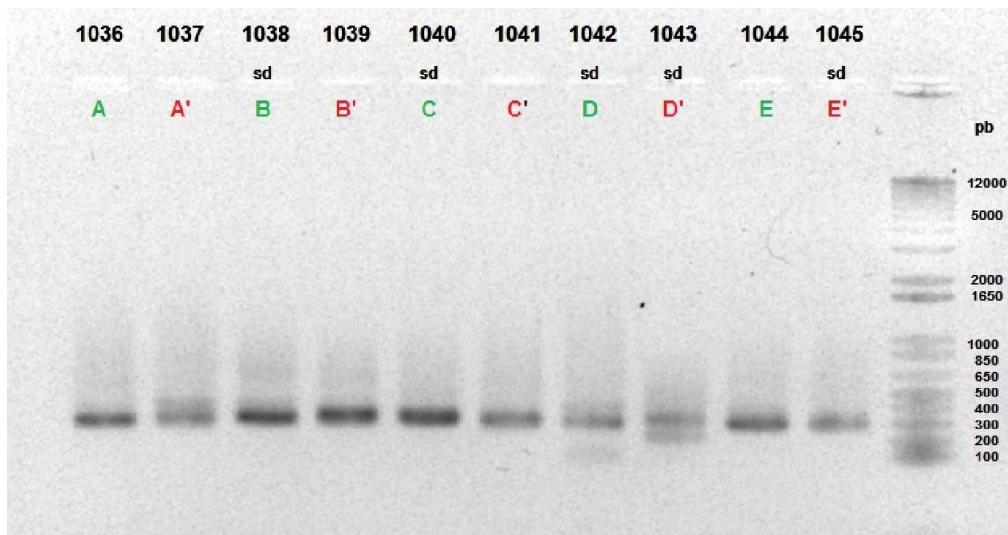


Figura 9: Amplificación por PCR anidada de la región ITS con los cebadores ITS1FGC-ITS2 sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 300-400 pb aproximadamente.

7.4 Amplificación por *touchdown* PCR para el ARNr 16S

Los resultados de la amplificación por *touchdown* PCR para el gen que codifica al ARNr 16S se indican en la Figura 10, como se puede observar el gel de agarosa muestra bandas correspondientes a los fragmentos amplificados con los cebadores F968GC-1401R (5 µl de cada muestra) y la escalera o marcador de longitud (100-12000 pb) muestra el tamaño del producto amplificado esperado entre 400-500 pb aproximadamente. Los resultados indican que hubo muy buena amplificación en todas las muestras y no se observa la presencia de dobles bandas. No obstante la banda que corresponde a la muestra 1040 es de menor intensidad.

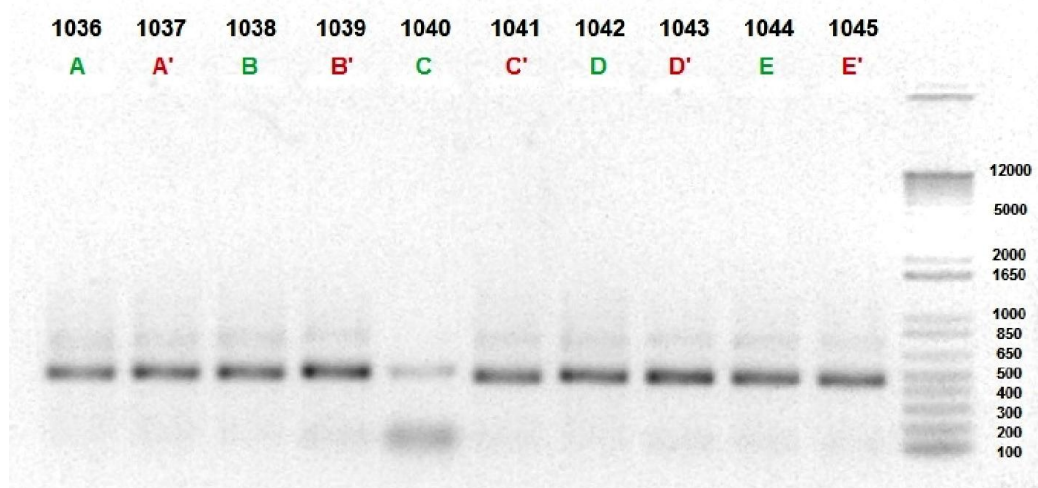


Figura 10: Amplificación por TD-PCR del ARNr 16S con los cebadores F968GC-1401R sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, bandas entre 300-400 pb aproximadamente.

7.5 Parámetros de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para el ARNr 16S

Para determinar las condiciones óptimas de DGGE para el gen que codifica al ARNr 16S se usaron en el primer ensayo muestras amplificadas previamente a partir de a) cepas puras de bacterias y b) ADN metagenómico de suelo y queso. Los dos geles contenían soluciones de poliacrilamida al 6% con una amplitud de rango desnaturalizante del 30% a 80%, los resultados se muestran a continuación:

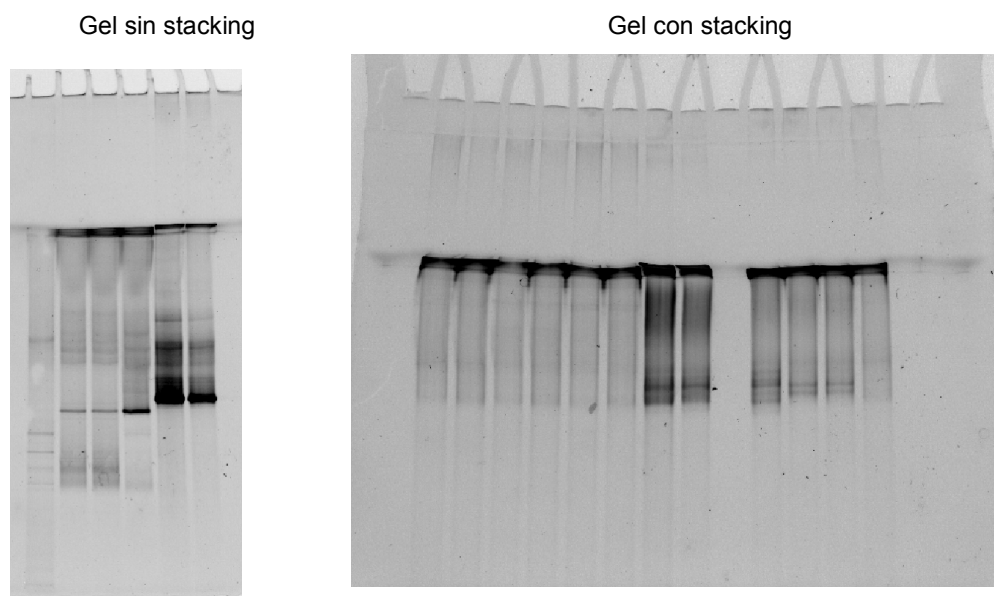


Figura 11: Geles de DGGE con una rango desnaturalizante de 30% a 80%.

En la Figura 11 se evidencia que en algunas muestras no hay ADN, con patrones de bandas claramente diferentes y no muy bien definidos. Además se observa que los patrones de bandas están comprimidos, razones por las cuales se realizaron más ensayos modificando la concentración de las soluciones de poliacrilamida al 7% (Véase en la parte metodológica).

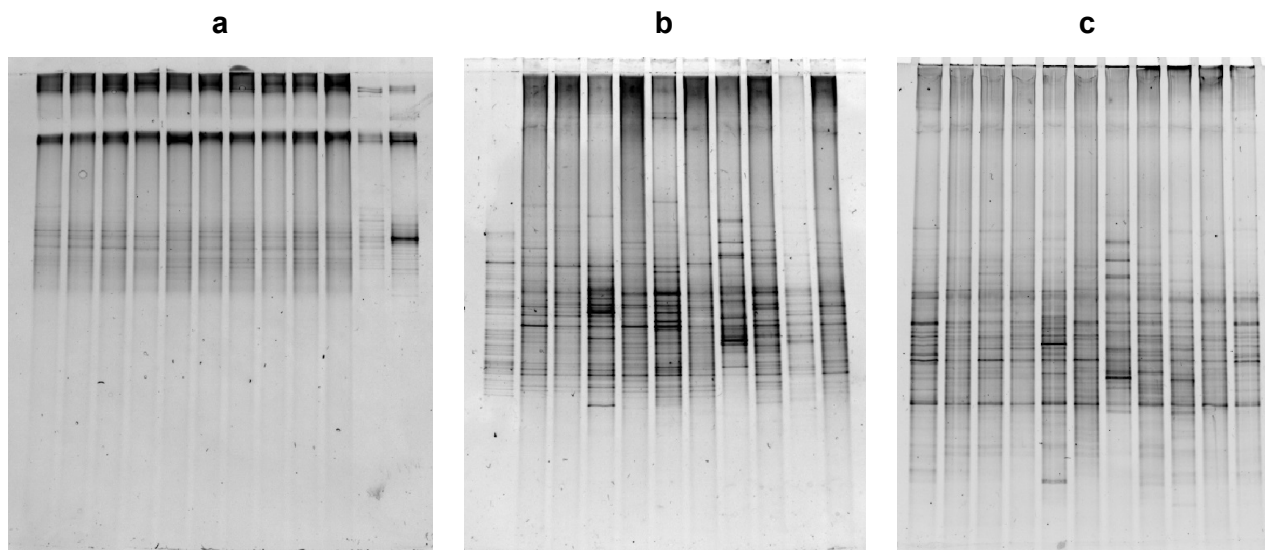


Figura 12: **a)** Gel DGGE con 40% - 70% de desnaturalizante; **b)** Gel DGGE con 30% - 60% de desnaturalizante y **c)** Gel DGGE con 30% - 55% de desnaturalizante.

Los resultados de la Figura 12(a) indican una mejora en la definición de las bandas, además se puede observar que hay ADN en todas las muestras. Sin embargo los patrones de bandas están comprimidos aproximadamente en el primer tercio del gel, lo cual significa que este gradiente no funcionó, por lo cual se realizó otro ensayo (Figura 12(b)). Este ensayo sugiere una notable mejora, generando patrones de bandas constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades. No obstante los patrones de bandas aún están comprimidos aproximadamente en la parte central del gel. Por lo que fue necesario realizar otro ensayo (Figura 12(c)). Este ensayo indica una mejor separación de bandas, pero acumuladas en parte superior del gel. Por lo que finalmente se decidió modificar ligeramente el gradiente a 35% - 55% de rango desnaturalizante (Figura 13), y se decidió que éste gradiente era el óptimo para el gen que codifica el ARNr 16S de bacterias bajo nuestras condiciones.

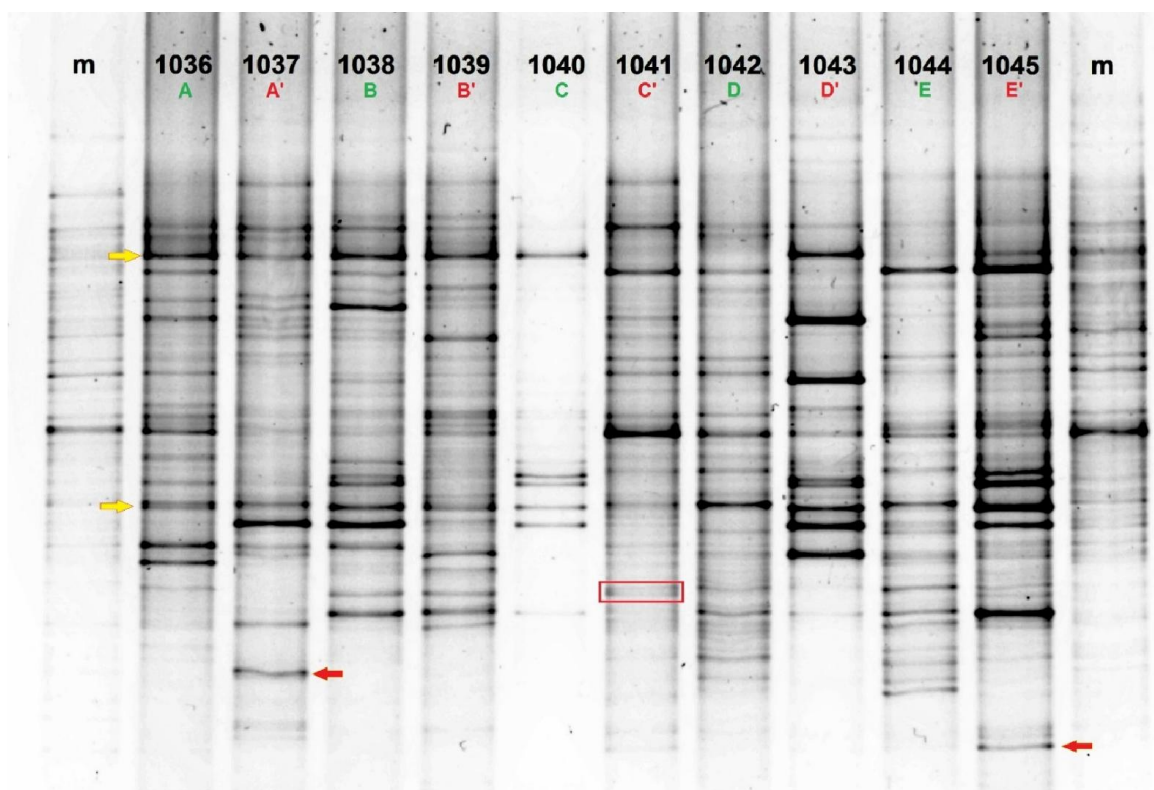


Figura 13: Perfil DGGE con un rango desnaturalizante de 35% a 55% para el ARNr 16S en comunidades bacterianas bajo manejo orgánico y convencional; m= marcador correspondiente a azucena convencional (muestra 1035).

La técnica de DGGE generó patrones de bandas para cada uno de los sitios muestreados y por cada tipo de manejo (orgánico y convencional) (Figura 13). Cada perfil de patrones de bandas estuvo constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades, las cuales representan la diversidad de especies bacterianas y la presencia relativa de cada especie en cada uno de los sitios muestreados, no obstante en algunos perfiles existe la presencia de bandas dobles debido a la formación de heterodúplex como las marcadas con el cuadro rojo. Además con excepción del patrón de bandas generado por la muestra 1040 es evidente que la cantidad de ADN y bandas presente en las demás muestras son muy similares, pero con patrones de bandas claramente diferentes. Pese a la existencia de diferencias entre todas las muestras se observa que algunas bandas como la señalada con la flecha amarilla están presentes en gran parte de los patrones de bandas pero con diferente intensidad, mientras que otras como las señaladas con la flecha roja solo están presentes en una o en muy pocas muestras.

7.6 Parámetros de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para la región ITS

Para determinar las condiciones óptimas de DGGE para la región ITS se realizaron ensayos previos con soluciones de poliacrilamida al 8%. En el primer ensayo se utilizó una amplitud de rango desnaturalizante de 30% a 50% (Figura 14(a)), los resultados indican patrones de bandas claramente diferentes y no muy bien definidos. Además se observan bandas comprimidas en la parte superior del gel, lo cual significa que este gradiente no funciona, razones por las cuales se realizaron más ensayos. El segundo ensayo (Figura 14(b)) sugiere una notable mejora, generando patrones de bandas constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades. No obstante las bandas aún están comprimidas y se evidencia la presencia de muchos artefactos en la parte superior. Por lo que fue necesario realizar otro ensayo (Figura 14(c)). Este ensayo indica una mejor separación de bandas, pero distribuidas hacia la parte superior del gel. Por lo que finalmente se decidió modificar ligeramente el gradiente a 20% - 35% de rango desnaturalizante (Figura 15), y se decidió que éste gradiente era el óptimo para la región ITS de hongos bajo nuestras condiciones.

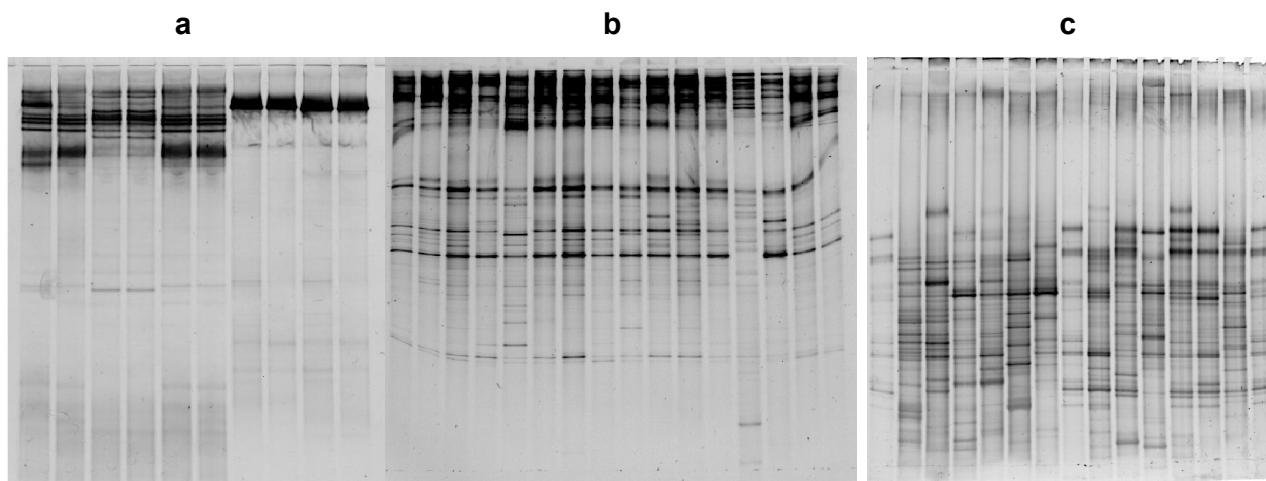


Figura 14 : **a)** Gel DGGE con 30% - 50% de desnaturalizante; **b)** Gel DGGE con 25% - 40% de desnaturalizante y **c)** Gel DGGE con 20% - 35% de desnaturalizante.

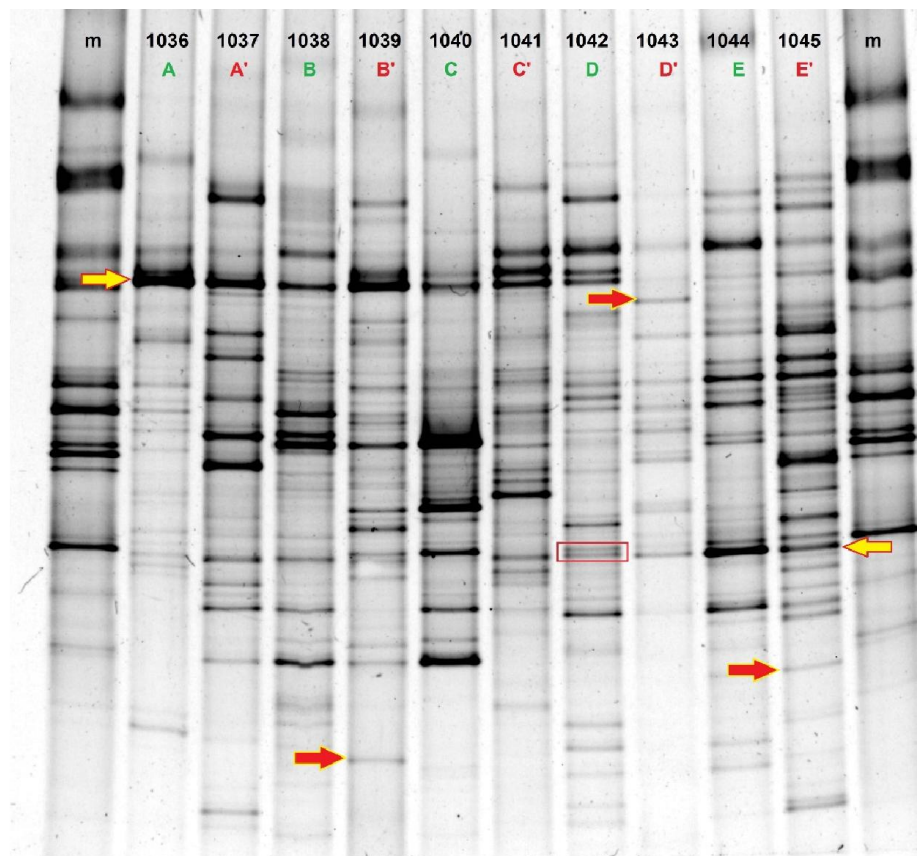


Figura 15: Perfil DGGE con un rango desnaturizante de 20% a 35% para la región ITS en comunidades fúngicas bajo manejo orgánico y convencional; m= marcador correspondiente a lechuga convencional (muestra 1020).

La técnica de DGGE generó patrones de bandas para cada uno de los sitios muestreados y por cada tipo de manejo (orgánico y convencional) (Figura 15). Cada perfil de patrones de bandas estuvo constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades, las cuales representan la diversidad de especies fúngicas y la presencia relativa de cada especie en cada uno de los sitios muestreados, no obstante en algunos perfiles existe la presencia de bandas dobles debido a la formación de heterodúplex como las marcadas con el cuadro rojo. Además con excepción del patrón de bandas generado por la muestra 1043 es evidente que la cantidad de ADN y bandas presente en las demás muestras son muy similares, pero con patrones de bandas claramente diferentes. Pese a la existencia de diferencias entre todas las muestras se observa que algunas bandas como la señalada con la flecha amarilla están presentes en gran parte de los patrones de bandas pero con diferente intensidad, mientras que otras como las señaladas con la flecha roja solo están presentes en una o en muy pocas muestras.

7.7 Análisis de la riqueza, estructura y diversidad biológica

De acuerdo a lo planteado en el objetivo 2, en la Tabla 6 se indican los índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) que colonizan suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

Tabla 6: Valores promedios de los Índices de Diversidad de las comunidades bacterianas (región 16S) de las muestras de suelo en sistemas de manejo orgánico y convencional, calculados a partir de los perfiles generados por la técnica de DGGE.

Orgánico ⁽¹⁾	A (1036)	B (1038)	C (1040)	D (1042)	E (1044)	$\bar{X} \pm SE$
H	2,72	2,79	1,78	2,67	2,77	$2,55 \pm 0,19$
S	16	19	7	16	18	$15,20 \pm 2,13$
E _H	0,9801	0,9486	0,9124	0,9642	0,9587	$0,95 \pm 0,01$
Convencional ⁽²⁾	A' (1037)	B' (1039)	C' (1041)	D' (1043)	E' (1045)	
H	2,63	2,92	2,42	2,25	2,87	$2,62 \pm 0,13$
S	15	20	13	11	21	$16,00 \pm 1,95$
E _H	0,9697	0,9739	0,9443	0,9389	0,9427	$0,95 \pm 0,01$

Índice de Riqueza de Especies (**S**), Índice de Shannon Weaver (**H**) e Índice de Equitatividad de Especies (**E_H**).

Tabla 7: Valores promedios de los Índices de Diversidad de las comunidades fúngicas (región ITS) de las muestras de suelo en sistemas de manejo orgánico y convencional, calculados a partir de los patrones de bandas generados por la técnica de DGGE.

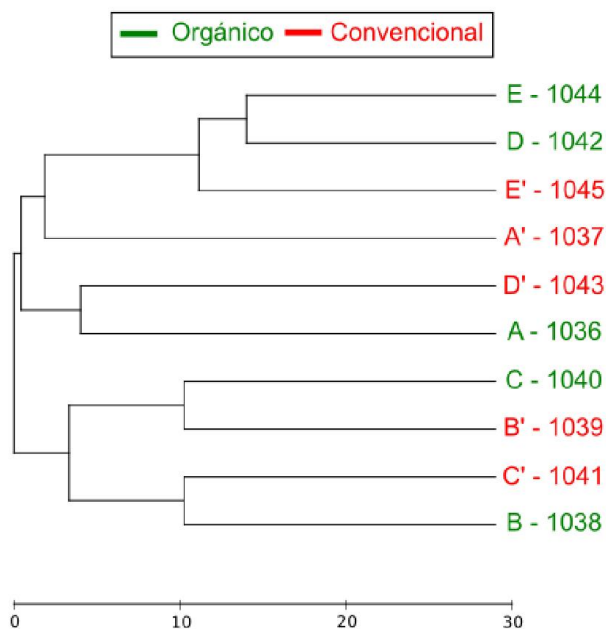
Orgánico ⁽¹⁾	A (1036)	B (1038)	C (1040)	D (1042)	E (1044)	$\bar{X} \pm SE$
H	2,25	2,53	2,37	2,84	2,69	$2,54 \pm 0,11$
S	14	15	13	22	18	$16,40 \pm 1,63$
E _H	0,8510	0,9346	0,9243	0,9202	0,9291	$0,91 \pm 0,02$
Convencional ⁽²⁾	A' (1037)	B' (1039)	C' (1041)	D' (1043)	E' (1045)	
H	2,51	2,78	2,67	2,26	3,06	$2,65 \pm 0,13$
S	15	19	17	10	25	$17,20 \pm 2,46$
E _H	0,9266	0,9446	0,9407	0,9794	0,9518	$0,95 \pm 0,01$

Índice de Riqueza de Especies (**S**), Índice de Shannon Weaver (**H**) e Índice de Equitatividad de Especies (**E_H**).

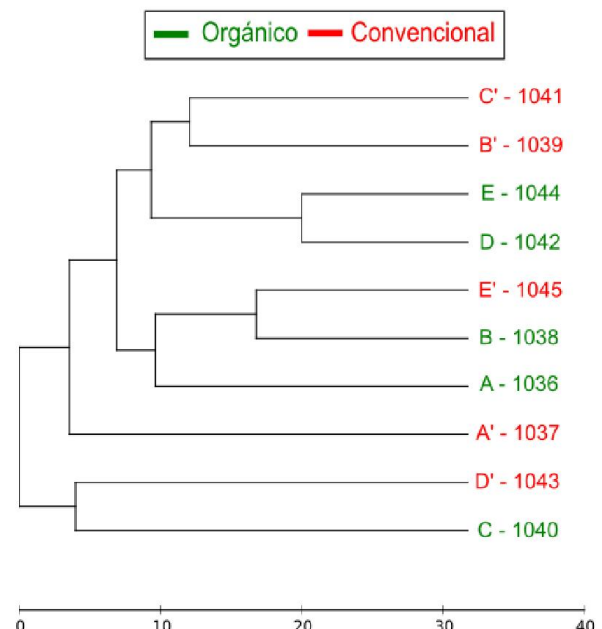
La tabla 6 y 7 evidencian que pese a que se observan pequeñas diferencias en los valores absolutos en los índices de diversidad para las comunidades fúngicas y bacterianas, estos no son estadísticamente distintos ($p > 0,05$) respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional (ver Tabla 8). Es evidente que la media de las muestras de suelo sometidas a ambos manejos tienen similares

Índices de Shannon Weaver (H), pese a que tienen diferentes valores de riqueza (S) lo que demuestra que H no aumenta linealmente con la riqueza y los valores promedio de equitatividad (E_H) corresponden a situaciones donde todas las especies son similarmente abundantes para ambos manejos ya que los valores observados se aproximan a 1.

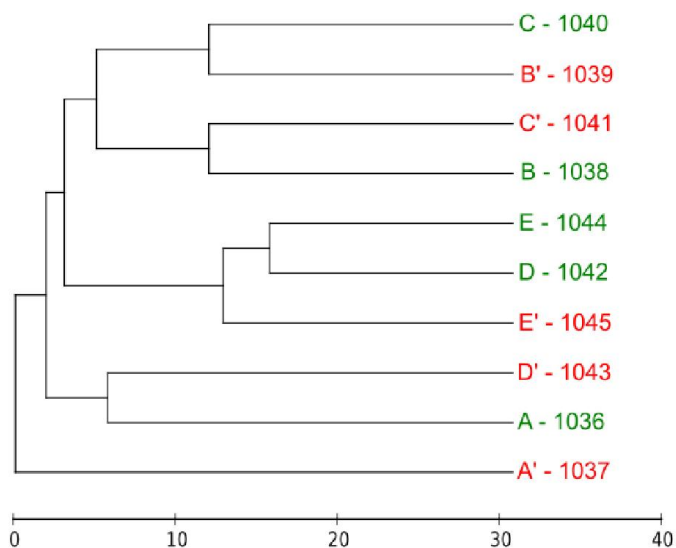
En cuanto la estructura de las comunidades microbianas derivada de los perfiles de DGGE (Figura 16), no se observaron agrupamientos consistentes de acuerdo al tipo de manejo. Sin embargo y a excepción del análisis de agrupamiento jerárquico Neighbour Joining ($a - 3$ y $b - 3$), en los demás agrupamientos tanto en comunidades bacterianas como fúngicas se destacan las muestras 1042 y 1044 pertenecientes a suelos manejados orgánicamente.



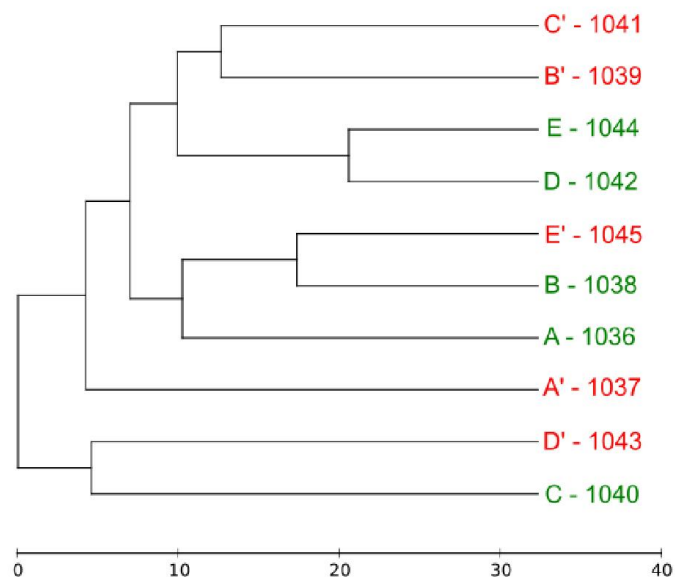
a - 1



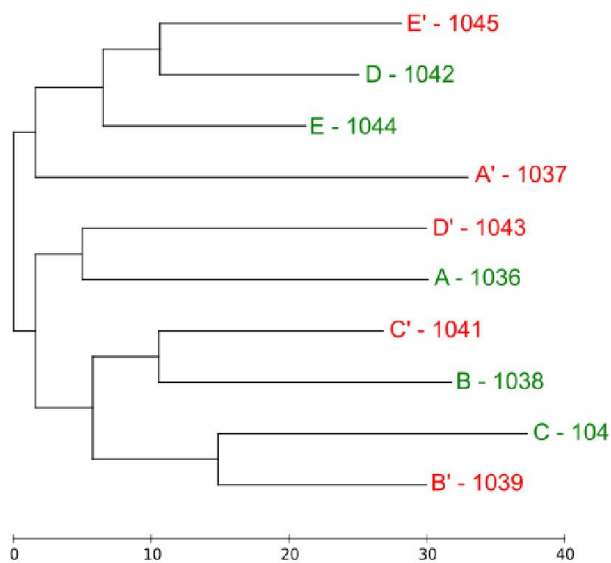
b - 1



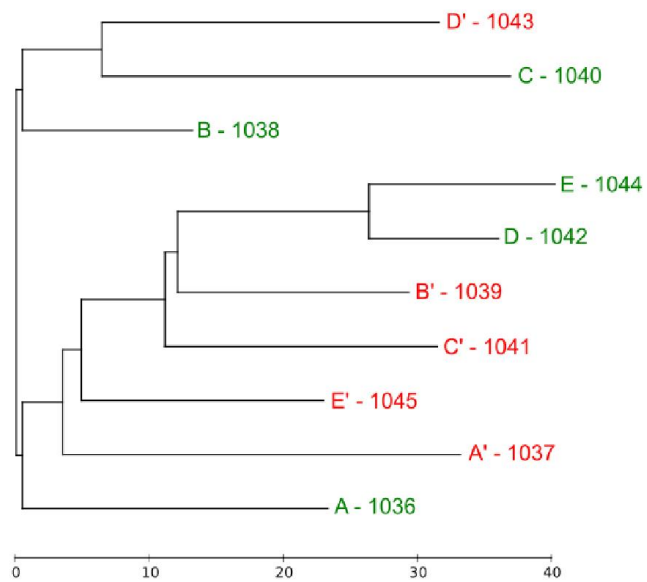
a - 2



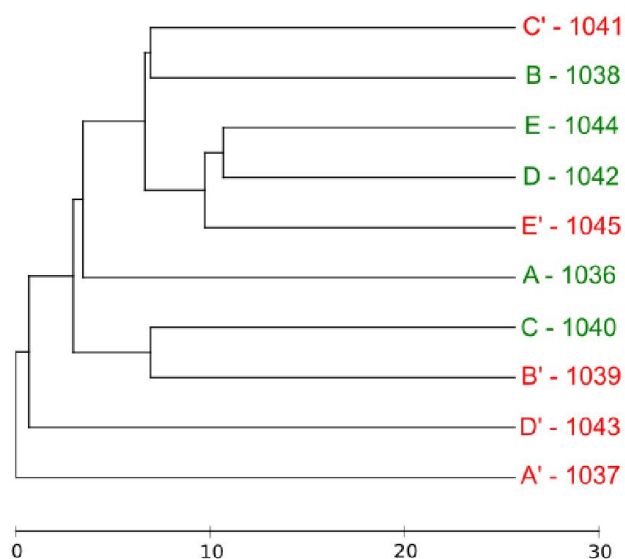
b - 2



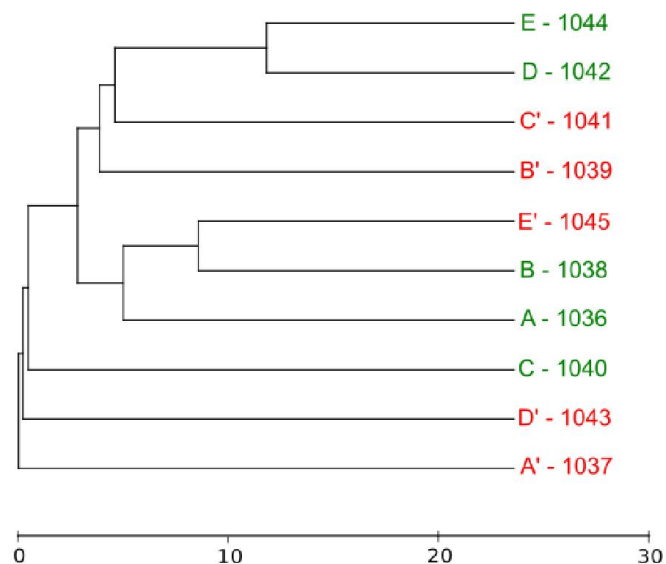
a - 3



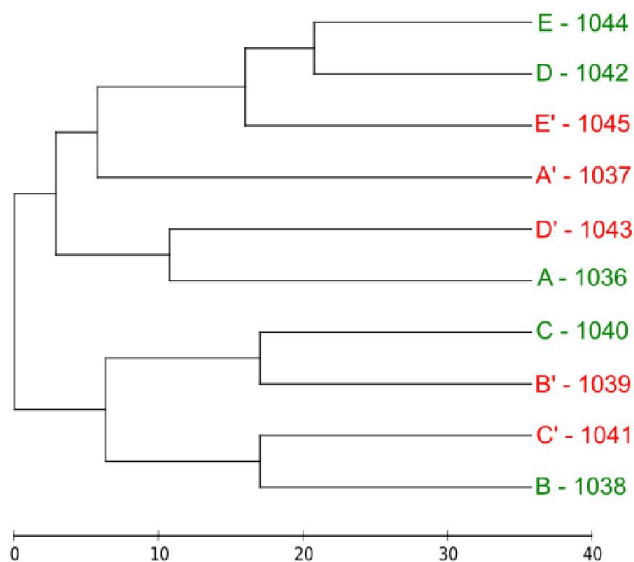
b - 3



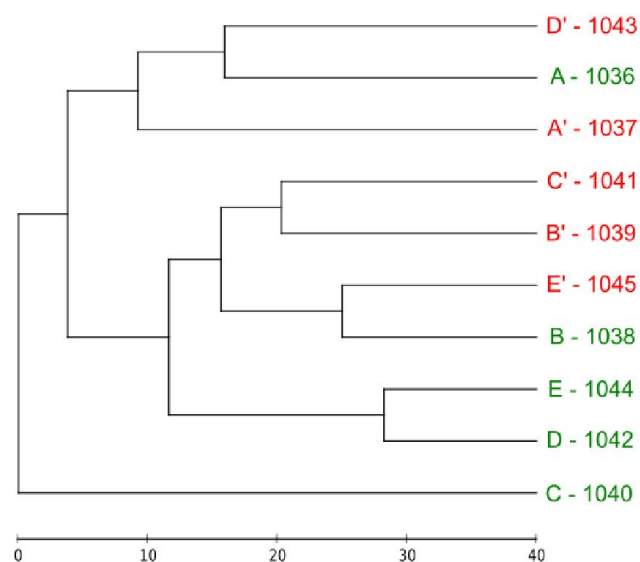
a - 4



b - 4



a - 5



b - 5

Figura 16: Análisis de agrupamiento jerárquico UPGMA (1), WPGMA (2), Neighbour Joining (3), Single Linkage (4) y Complete Linkage (5) de perfiles de DGGE de fragmentos amplificados de la región ITS de hongos (a) y del gen que codifica al ARNr 16S para bacterias (b) a partir de ADN metagenómico en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico.

7.8 Comparación entre las características físico-químicas del suelo, riqueza e índices de diversidad respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional

De acuerdo a lo planteado en el objetivo 3, con el fin de determinar las posibles diferencias entre los índices de riqueza y diversidad además de las características físicas y químicas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional (Tabla 8), nos planteamos las siguientes hipótesis: 1) H_0 : No existen diferencias en la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas y las características físicas-químicas presentes en suelos cultivados con Banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional y 2) H_a : Existen diferencias en la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas y las características físicas-químicas presentes en suelos cultivados con Banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional.

Tabla 8: Prueba t ($p < 0,05$) y prueba U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para las características físico-químicas del suelo, riqueza e índices de diversidad respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional.

	Manejo				1	2
	Orgánico		Convencional			
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	valor p	valor p
d.a.	0,88	0,24	1,01	0,14	0,337	0,513
d.r.	2,26	0,13	2,32	0,16		
Porosidad	0,6068	0,1157	0,5742	0,0294		
pH	5,96	0,58	6,30	1,04		
C.E.	0,33	0,20	0,40	0,22		
M.O.S.	0,0802	0,0679	0,0816	0,0169	0,885	0,175
C.O.S.	0,0465	0,0394	0,0473	0,0098		0,175
Humedad	0,3462	0,1268	0,3566	0,0917		0,175
Saturación	0,4920	0,1139	0,5082	0,0236		
Arcilla	0,1872	0,0645	0,2170	0,1229		
Limo	0,2775	0,1337	0,2646	0,1816	0,901	
Arena	0,5353	0,1964	0,5184	0,2514	0,909	
H-ITS	2,54	0,24	2,65	0,30	0,508	0,917
S-ITS	16,40	3,65	17,20	5,49	0,793	
EH-ITS	0,9119	0,0344	0,9486	0,0195	0,071	
H-16S	2,55	0,43	2,62	0,29	0,789	
S-16S	15,20	4,76	16	4,36		
EH-16S	0,9528	0,0253	0,9539	0,0165		

1: prueba T; 2: U de Mann-Whitney

Los resultados de la Tabla 8 indican que no existen argumentos necesarios para rechazar la hipótesis nula (H_0) ya que no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables estudiadas respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional.

7.9 Correlación entre los índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas frente a las características físico-químicas del suelo

Además de caracterizar la estructura, riqueza y diversidad de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) presentes en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico, se investigaron las posibles relaciones entre las características físico-químicas del suelo y los índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (UTOs). Para ello nos planteamos las siguientes hipótesis: 1) H_0 : No existen relaciones entre las características físico-químicas y los índices de diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con Banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional y 2) H_a : Existen relaciones entre las características físico-químicas frente a los índices de riqueza y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con Banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional.

Los resultados de las Tablas 45 y 46 (ver Anexo 10) nos indican que existen 4 correlaciones positivas significativas entre: el índice de Shannon Weaver y la riqueza con el pH, para ambas comunidades microbianas (Bacterias y hongos) y 2 correlaciones negativas significativas entre: la porosidad y la cantidad de arena del suelo con el índice de equitatividad para las comunidades fúngicas, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula. En las figuras 35, 46 y 47 (ver Anexo 10) se observan regresiones lineales que explican el comportamiento para cada correlación significativa.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio nos planteamos investigar las posibles diferencias y similitudes en la estructura, riqueza y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo en 5 fincas orgánicas y 5 fincas convencionales certificadas usando la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Los resultados obtenidos nos permitieron afirmar que no existen diferencias en las comunidades microbianas respecto al manejo orgánico frente al manejo convencional. No obstante, para llegar a esta conclusión debimos optimizar las condiciones óptimas de DGGE, puesto que como es bien conocido dependiendo del sitio de trabajo estas condiciones pueden variar ligeramente. Los resultados obtenidos nos permitieron llegar a definir un gradiente óptimo de 35% a 55% [7 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1)] para la separación de los fragmentos 16S y un gradiente de 20% a 35% [8 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1)] para la separación de los fragmentos ITS. Estos gradientes no coinciden con los propuestos por Brons y Van Elsas (2008), Wu et al. (2013) y Liu et al. (2015), quienes usaron un gradiente de 30% a 50% y 20% a 45% para separar de los fragmentos ITS, y un gradiente de 40% a 70% para separar de los fragmentos 16S.

Una vez optimizadas las condiciones de DGGE, se estudió la relación que existe entre los índices de diversidad, la riqueza y el tipo de manejo. Nuestros resultados mostraron que la diversidad, indicada por el índice de Shannon Weaver (**H**) presenta pequeñas diferencias en los valores absolutos de acuerdo al tipo de manejo en ambas comunidades microbianas (bacterias y hongos). Sin embargo, las comparaciones entre muestras de los sistemas orgánicos y convencionales no revelaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para índice de Shannon Weaver (**H**) (Tabla 8). Este resultado es similar al estudio publicado por van Diepeningen et al. (2006) en el cual usaron PCR-DGGE para comparar comunidades de bacterianas del suelo en 13 granjas orgánicas y 14 granjas convencionales vecinas, donde **H** tampoco fue significativamente distinto. No obstante, en otro estudio comparativo en 20 fincas vecinas **H** fue mayor en las granjas orgánicas (Drinkwater et al. 1995). Del mismo modo se evidenció que no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el índice de Riqueza de



Especies (**S**) en cuanto al manejo (orgánico y convencional) (Tabla 8), resultado similar al demostrado por Wu et al. (2008), pero contrasta nuestro índice de Equitatividad de Especies (**E_H**) en la cual las prácticas de manejo afectaron significativamente la equitatividad de las comunidades. Muchos factores pueden influir en los índices de diversidad **S**, **H** y **E_H**, incluyendo la cantidad y calidad de las enmiendas orgánicas y convencionales, las actividades antropogénicas, el clima, el tipo de cultivo, el tipo de suelo, el uso de cultivos de cobertura y el historial de manejo de la granja (van Diepeningen et al. 2006). Por ejemplo, las cantidades de estiércol o compost añadido al suelo afectan a las comunidades bacterianas del suelo (Saison et al. 2006). En un estudio realizado por Shen et al. (2013) se evaluó el efecto de diferentes compost y un bio-fertilizante orgánico sobre la incidencia de la marchitez en banano por *Fusarium* mediante la técnica de DGGE, los resultados revelaron que en parcelas donde se aplicó compost de cerdo mostraron una incidencia más grave a la enfermedad de la marchitez y dio lugar a la disminución de la riqueza bacteriana, diversidad y equitatividad. Sin embargo, la aplicación del bio-fertilizante moduló la estructura de la comunidad bacteriana, incrementando la estructura (es decir, más bandas detectadas) y la composición en comunidades bacterianas (es decir, más bandas con mayor intensidad). Estos resultados difieren de los nuestros, al demostrar que la aplicación de enmiendas orgánicas puede alterar la composición de las comunidades microbianas. Finalmente en cuanto a la estructura de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) derivada de los perfiles de DGGE en nuestros resultados no se observaron agrupamientos consistentes de acuerdo al tipo de manejo, resultado opuesto al reportado en Argentina por Vega Avila et al. (2015) donde los agrupamientos fueron estadísticamente significativos, agrupando por separado las muestras de los viñedos orgánicos y convencionales. No obstante la Figura 16 muestra dos agrupamientos interesantes en ambas comunidades estudiadas, las muestras agrupadas son: D - 1042 y E - 1044 pertenecientes a suelos manejados orgánicamente. Este agrupamiento podría sugerir que las comunidades de hongos y bacterias en esas dos muestras manejadas orgánicamente son muy similares entre sí. Cabe recalcar que los resultados obtenidos no permiten conocer si los UTOs generados por la técnica de DGGE (cada una de las bandas) corresponden a microorganismos patógenos o microorganismos benéficos.

En vista de que no observamos resultados consistentes que apoyaran nuestra hipótesis, nos planteamos la posibilidad de estudiar las relaciones entre las características físico-químicas y los índices de diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: orgánico y convencional. Los resultados obtenidos indican una buena correlación positiva entre: el pH de suelo y el índice de Shannon Weaver para las comunidades fúngicas, el $R^2=0,583$ explica 58,3 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad en el pH el H-ITS incrementa 0,25 veces (Figura 35-1); otra correlación positiva entre: el pH del suelo y el índice de Shannon Weaver para las comunidades bacterianas, el $R^2=0,568$ que explica 56,8 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad en el pH el H-16S incrementa 0,32 veces (Figura 35-2); otra correlación positiva entre: el pH del suelo y la riqueza para las comunidades fúngicas, el $R^2=0,586$ que explica 58,6 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad en el pH el S-ITS incrementa 4,16 veces (Figura 36-3); y una última correlación positiva entre: el pH del suelo y la riqueza para las comunidades bacterias, el $R^2=0,592$ que explica 59,2 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad en el pH el S-16S incrementa 4,09 veces (Figura 36-4). Estos resultados se asemejan a los a los publicados por Lauber et al. (2009), Kim et al. (2016) y Zhang et al. (2013) donde la diversidad de las comunidades fúngicas y bacterianas también se correlacionaron con el pH del suelo. Además también se destacan dos correlaciones negativas entre: la porosidad del suelo y la Equitatividad en las comunidades fúngicas, el $R^2=0,631$ que explica 63,1 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad de la porosidad el E_H -ITS disminuye 0,32 veces (Figura 37-5) y el contenido de arena del suelo con la Equitatividad para las comunidades fúngicas, el $R^2=0,495$ que explica 49,5 % de la variabilidad observada y la ecuación de la recta nos indica que por cada aumento de una unidad en el contenido de arena el E_H -ITS disminuye 0,11 veces (Figura 37-6).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la caracterización física y química en suelos cultivados con banano no presentaron diferencias significativas de acuerdo al manejo.

La DGGE nos permitió conocer de una forma rápida y aproximada la composición microbiana en suelos cultivados con banano sometidos a dos tipos de manejo: convencional y orgánico.

Atendiendo al número de bandas generadas a partir de los perfiles de DGGE, no se evidenció una clara diferencia en la diversidad, riqueza y estructura de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano de acuerdo al tipo de manejo sugiriendo que probablemente otros factores son quienes determinan diversidad, riqueza y estructura de las comunidades microbianas de los suelos estudiados.

La caracterización de las propiedades físico-químicas y su estrecha relación de dependencia con los índices de diversidad determinó tres aspectos: 1) conforme el pH se aproxima a neutro y básico incrementa tanto la diversidad como la riqueza en ambas comunidades estudiadas, 2) mientras mayor porcentaje de poros exista menos equitativa es la comunidad de hongos y 3) mientras mayor porcentaje de arena en el suelo menos equitativa es la comunidad de hongos.

Estos resultados mejoran nuestro entendimiento sobre la relación entre la diversidad microbiana en suelos cultivados con banano y los efectos antropogénicos a los cuales son sometidos.



10. RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares en otras zonas dedicadas al cultivo de banano, y considerar un mayor número de muestras a analizar para obtener resultados más representativos a nivel regional.

Mediante secuenciación en estudios posteriores identificar si los microorganismos presentes en estos dos sistemas de manejo son microorganismos patógenos o microorganismo benéficos.



11. BIBLIOGRAFÍA

Adak, A; Prasanna, R; Babu, S; Bidyarani, N; Verma, S; Pal, M; Shivay, YS; Nain, L. 2016. Micronutrient enrichment mediated by plant-microbe interactions and rice cultivation practices. *Journal of Plant Nutrition* 39(9): 1216-1232.

Akhtar, MS; Siddiqui, ZA. 2009. Use of plant growth-promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea. *Australasian Plant Pathology* 38(1): 44-50.

Allison, LE. 1965. Organic carbon. *Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy. California, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, p.1376-1378.

Babalola, OO. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32(11): 1559-1570.

Bashan, Y; Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36(9): 591-608.

Blake, GR; Hartge, KH. 1986. Bulk density. *Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Madison, s.e., p.363-375.

Blake, GR; Hartge, KH. 1986. Particle density. *Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Madison, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, p.377-382.

Borneman, J; Triplett, EW. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7): 2647-2653.

Bossio, DA; Scow, KM; Gunapala, N; Graham, KJ. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36(1): 1-12.

Bouyoucos, GJ. 1962. Hydrometer method mproved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal* 54(5): 464.

Brons, JK; Van Elsas, JD. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9): 2717-2727.

Van Bruggen, AHC; Semenov, AM. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15(1): 13-24.



Chaudhry, V; Rehman, A; Mishra, A; Chauhan, PS; Nautiyal, CS. 2012. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial Ecology* 64(2): 450-460.

Christensen, BT. 1996. Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure. *Evaluation of soil organic matter models*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, v.38, p.143-159.

Cornejo Romero, A; Serrato Díaz, A; Rendón Aguilar, B; Rocha Munive, MG. 2014. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1ra ed. Mexico D.f., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 1-274 p.

Daniel, R. 2004. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology* 15(3): 199-204.

Van Diepeningen, AD; de Vos, OJ; Korthals, GW; van Bruggen, AHC. 2006. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 31(1-2): 120-135.

Dilly, O; Bloem, J; Vos, A; Munch, JC. 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 468-474.

Dodd, IC; Zinovkina, NY; Safronova, VI; Belimov, AA. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology* 157(3): 361-379.

Drinkwater, LE; Letourneau, DK; Workneh, F; van Bruggen, AHC; Shennan, C. 1995. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California. *Ecological Applications* 5(4): 1098-1112.

Duarte, S; Cássio, F; Pascoal, C. 2012. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology – insights from freshwaters. *Centre of Molecular and Environmental Biology* 2012: 173-196.

Embong, Z; Wan Hitam, WH; Yean, CY; Rashid, NHA; Kamarudin, B; Abidin, SKZ; Osman, S; Zainuddin, ZF; Ravichandran, M. 2008. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC ophthalmology* 8(1): 7.

Feng, Y; Motta, AC; Reeves, DW; Burmester, CH; Van Santen, E; Osborne, JA. 2003. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35(12): 1693-1703.

Fischer, SG; Lerman, LS. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16(1): 191-200.



Fisher, MM; Triplett, EW. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10): 4630-4636.

Fonseca, VG; Nichols, B; Lallias, D; Quince, C; Carvalho, GR; Power, DM; Creer, S. 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 40(9): 1-9.

Garbeva, P; van Veen, JA; van Elsas, JD. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Reviews in Phytopathology* 42: 243-270.

Gardner, WH. 1986. Water content. *Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. s.l., American Society of Agronomy, p.493-544.

Garland, JL; Mills, AL. 1991. Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community level sole carbon source utilization. *Applied and environmental microbiology* 57(8): 2351-2359.

Giller, PS. 1996. The diversity of soil communities, the «poor man»s tropical rainforest. *Biodiversity and Conservation* 5(2): 135-168.

Glick, BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1-15.

Green, SJ; Leigh, MB; Neufeld, JD. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, p.4137-4158.

Griffiths, BS; Ritz, K; Ebbelwhite, N; Dobson, G. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31(1): 145-153.

Griffiths, RI; Whiteley, AS; O'Donnell, AG; Bailey, MJ. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5488-5491.

Ibekwe, AM; Kennedy, AC. 1998. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *Fems Microbiology Ecology* 26(2): 151-163.

Ibekwe, AM; Kennedy, AC. 1999. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant and Soil* 206(2): 151-161.

Islam, MR; Trivedi, P; Palaniappan, P; Reddy, MS; Sa, T. 2009. Evaluating the effect of fertilizer application on soil microbial community structure in rice based cropping system using fatty acid methyl esters (FAME) analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(6): 1115-1117.



Kim, JM; Roh, A-S; Choi, S-C; Kim, E-J; Choi, M-T; Ahn, B-K; Kim, S-K; Lee, Y-H; Joa, J-H; Kang, S-S; Lee, SA; Ahn, J-H; Song, J; Weon, H-Y. 2016. Soil pH and electrical conductivity are key edaphic factors shaping bacterial communities of greenhouse soils in Korea. *Journal of Microbiology* 54(12): 838-845.

Kirk, JL; Beaudette, LA; Hart, M; Moutoglis, P; Klironomos, JN; Lee, H; Trevors, JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58(2): 169-188.

Klute, A; Danielson, RE; Sutherland, PL. 1986. Porosity. *Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Madison, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, p.443-461.

Klute, A. 1986. Water retention: Laboratory methods. *Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Madison, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, p.635-662.

Korbie, DJ; Mattick, JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols* 3(9): 13-15.

Kozdrój, J; van Elsas, JD. 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils* 31(5): 372-378.

Lauber, CL; Hamady, M; Knight, R; Fierer, N. 2009. Pyrosequencing based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology* 75(15): 5111-5120.

Liu, J; Yu, Y; Cai, Z; Bartlam, M; Wang, Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(9): 1387-1395.

Liu, W. T; Marsh, TL; Cheng, H; Forney, LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 63(11): 4516-22.

Ma, JF. 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24(4): 267-281.

Magdoff, FR; Tabatabai, MA; Hanlon, EA; Tabatabai, MA. 1996. Soil organic matter testing: An overview. *Soil Organic Matter: Analysis and Interpretation*. s.l., Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, p.1-9.

Magurran, AE. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Dordrecht, Springer Netherlands, 179 p.



Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* 42(1): 35-59.

Mendes, LW; Kuramae, EE; Navarrete, AA; van Veen, JA; Tsai, SM. 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *International Society for Microbial Ecology* 8(8): 1577-1587.

Mendes, R; Garbeva, P; Raaijmakers, JM. 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews* 37(5): 634-663.

Miller, KM; Tobi, JM; Schulze, AD; Withler, RE. 1999. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): A Rapid and Sensitive Technique to Screen Nucleotide Sequence Variation in Populations Research Report. *BioTechniques* 27(5): 1016-1030.

Mocali, S; Benedetti, A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* 161(6): 497-505.

Moreno, CE. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. 1 ed. Zaragoza, s.e., v.1, 84 p.

Moubayidin, L; Di Mambro, R; Sabatini, S. 2009. Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* 14(10): 557-562.

Mulder, C; De Zwart, D; Van Wijnen, HJ; Schouten, AJ; Breure, AM. 2003. Observational and simulated evidence of ecological shifts within the soil nematode community of agroecosystems under conventional and organic farming. *Functional Ecology* 17(4): 516-525.

Murray, AE; Hollibaugh, JT; Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2676-2680.

Muyzer, G; Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1): 127-141.

Muyzer, G; de Waal, EC; Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59(3): 695-700.

Myers, RM; Maniatis, T; Lerman, LS. 1987. [31] Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527.



Myers, RM; Sheffield, VC; Cox, DR. 1989. Mutation detection by PCR, GC-Clamps, and denaturing gradient gel electrophoresis. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. London, Palgrave Macmillan UK, p.71-88.

Nannipieri, P; Ascher, J; Ceccherini, MT; Landi, L; Pietramellara, G; Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science 54(4): 655-670.

Nautiyal, CS; Chauhan, PS; Bhatia, CR. 2010. Changes in soil physico-chemical properties and microbial functional diversity due to 14 years of conversion of grassland to organic agriculture in semi-arid agroecosystem. Soil and Tillage Research 109(2): 55-60.

Neilson, JW; Jordan, FL; Maier, RM. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. Journal of Microbiological Methods 92(3): 256-263.

Nüsslein, K; Tiedje, JM. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. Applied and Environmental Microbiology 65(8): 3622-3626.

Pampulha, ME; Oliveira, A. 2006. Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. Current Microbiology 53(3): 238-243.

Porcel, R; Zamarreño, ÁM; García Mina, JM; Aroca, R. 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. BMC plant biology 14(1): 36.

Poulsen, PHB; Al-Soud, WA; Bergmark, L; Magid, J; Hansen, LH; Sørensen, SJ. 2013. Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial - prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. Soil Biology and Biochemistry 57: 784-793.

Prosser, JI. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. Plant and Soil 244(1-2): 9-17.

Ranjard, L; Brothier, E; Nazaret, S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. Applied and Environmental Microbiology 66(12): 5334-5339.

Rhoades, JD. 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods. M, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, p.417-435.

Richardson, AE. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Functional Plant Biology 28(9): 897.



Rodicio, M del R; Mendoza, M del C. 2004. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4): 238-245.

Rodrigues, JLM; Pellizari, VH; Mueller, R; Baek, K; Jesus, E da C; Paula, FS; Mirza, B; Hamaoui, GS; Tsai, SM; Feigl, B; Tiedje, JM; Bohannan, BJM; Nüsslein, K. 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(3): 988-993.

Roesch, LFW; Fulthorpe, RR; Riva, A; Casella, G; Hadwin, AKM; Kent, AD; Daroub, SH; Camargo, FAO; Farmerie, WG; Triplett, EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology* 1(4): 283-90.

Rossmann, B; Müller, H; Smalla, K; Mpiira, S; Tumuhairwe, JB; Staver, C; Berg, G. 2012. Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology* 78(14): 4933-4941.

Saison, C; Degrange, V; Oliver, R; Millard, P; Commeaux, C; Montange, D; Le Roux, X. 2006. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: Effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* 8(2): 247-257.

Sarma, BK; Yadav, SK; Singh, S; Singh, HB. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* 87: 25-33.

Shen, Z; Wang, B; Lv, N; Sun, Y; Jiang, X; Li, R; Ruan, Y; Shen, Q. 2015. Effect of the combination of bio-organic fertiliser with *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 on the control of banana *Fusarium* wilt disease, crop production and banana rhizosphere culturable microflora. *Biocontrol Science and Technology* 25(6): 716-731.

Shen, Z; Wang, D; Ruan, Y; Xue, C; Zhang, J; Li, R; Shen, Q. 2014. Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application. *PLoS ONE* 9(5): 1-10.

Shen, Z; Zhong, S; Wang, Y; Wang, B; Mei, X; Li, R; Ruan, Y; Shen, Q. 2013. Induced soil microbial suppression of banana *Fusarium* wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. *European Journal of Soil Biology* 57: 1-8.

Siddiqui, ZA. 2005. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, p.111-142.



Soupir, ML; Mostaghimi, S; Yagow, ER; Hagedorn, C; Vaughan, DH. 2006. Transport of fecal bacteria from poultry litter and cattle manures applied to pastureland. *Water, Air, and Soil Pollution* 169(1-4): 125-136.

Sparks, DL; Page, AL; Helmke, PA; Loeppert, RH; Thomas, GW. 1996. Soil pH and soil acidity. s.l., Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, 475-490 p.

Stepanova, AN; Alonso, JM. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12(5): 548-555.

Tabacchioni, S; Chiarini, L; Bevivino, A; Cantale, C; Dalmastri, C. 2000. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecology* 40(3): 169-176.

Theron, J; Cloete, TE. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical reviews in microbiology* 26(1): 37-57.

Tiedje, JM; Asuming-Brempong, S; Nüsslein, K; Marsh, TL; Flynn, SJ. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13(2): 109-122.

Tilman, D; Cassman, KG; Matson, PA; Naylor, R; Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418(6898): 671-7.

Torsvik, V; Daae, FL; Sandaa, R-A; Øvreås, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64(1): 53-62.

Torsvik, V; Goksøyr, J; Daae, FL. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56(3): 782-787.

Torsvik, V; Øvreås, L; Thingstad, TF. 2002. Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296(5570): 1064-1066.

Torsvik, V; Sørheim, R; Goksøyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17(3-4): 170-178.

Trevors, JT. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 101(1-4): 45-67.

Trivedi, P; Delgado Baquerizo, M; Anderson, IC; Singh, BK. 2016. Response of soil properties and microbial communities to agriculture: implications for primary productivity and soil health indicators. *Frontiers in Plant Science* 7(990): 1-13.



Triviño, C. 2003. Control biológico de nematodos en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Disponible en http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control_biologico_nematodos_Ecuador.pdf

Tufiño, C; Espín, E; Villareal, T; Proaño, K; Medina, ME. 2011. Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares (hma) y la fertilización, sobre el crecimiento y desarrollo de plantas micropropagadas de banano (*Musa paradisiaca*) durante la fase de aclimatación. Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador. Disponible en http://www.espe.edu.ec/portal/files/sitio_congreso_2011/papers/V11.pdf

Vega Avila, AD; Gumiere, T; Andrade, PAM; Lima Perim, JE; Durrer, A; Baigori, M; Vazquez, F; Andreote, FD. 2015. Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 107(2): 575-588.

Vejan, P; Abdullah, R; Khadiran, T; Ismail, S; Nasrulhaq Boyce, A. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules* 21(5): 1-17.

Velazco, CC; Vargas, MA. 2009. Correlación entre las características del suelo y los nemátodos de la raíces del Banano (*Musa AAA*) en Ecuador. *Agronomía Mesoamericana* 20(2): 361-369.

Wu, B; Tian, J; Bai, C; Xiang, M; Sun, J; Liu, X. 2013. The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. *The ISME Journal* 7(7): 1299-1309.

Wu, T; Chellemi, DO; Graham, JH; Martin, KJ; Roskopf, EN. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbial Ecology* 55(2): 293-310.

Yao, H; He, Z; Wilson, MJ; Campbell, CD. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microbial ecology* 40: 223-237.

Zak, DR; Holmes, WE; White, DC; Peacock, AD; Tilman, D. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology* 84(8): 2042-2050.

Zak, J; Willig, M; Moorhead, D; Wildman, H. 1994. Accelerated paper: functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26(9): 1101-1108.

Zhang, XF; Zhao, L; Xu, SJ; Liu, YZ; Liu, HY; Cheng, GD. 2013. Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. *Journal of Applied Microbiology* 114(4): 1054-1065.



12. ANEXOS

Anexo 1: encuesta al encargado o propietario del cultivo sobre la prácticas culturales aplicadas durante el ciclo actual, historia de cultivo y descripción de la fisiografía del sitio y características del suelo.

Encuesta de manejo e historia del sitio

Código de muestreo:

Fecha de muestreo:

Nombre del encargado:

Nombre del predio (si tuviera):

Tipo de sistema de producción: **ORGÁNICO** **CONVENCIONAL**

Cultivo:

Edad del cultivo en la parcela donde se va a muestrear:

Cobertura al momento del muestreo (seleccione el que corresponda):

- Suelo sin cobertura
- Pocas malezas
- Muchas malezas
- Cultivo de cobertura o asociado (indique cuál: _____)
- Otra (especifique: _____)

Aportes al suelo (seleccione todos los que apliquen):

- Fertilizantes sintéticos:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:
- Materia orgánica:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:
- Pesticidas:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:

Laboreo del suelo aplicado en los últimos 5 años (seleccione los que apliquen):

- Labranza mecanizada
 - Profundidad
 - Frecuencia
- Labranza con tracción animal
 - Profundidad
 - Frecuencia
- Labranza manual
 - Profundidad
 - Frecuencia
- No hace labranza



Riego y drenaje

- No riega (cultivo de secano)
- Riego por surcos
- Riego por inundación
- Riego por aspersión
- Riego por goteo

Aportes al cultivo

- Principales insumos que aplica usted a la parte aérea del cultivo (seleccione todos los que apliquen indicando el nombre de los productos usados)
 - Insecticidas sintéticos:
 - Fungicidas sintéticos:
 - Estimulantes/hormonas sintéticos:
 - Insecticidas orgánicos:
 - Bioles:
 - Té de estiércol/té de frutas:
 - Elementos químicos (ej. Azufre, polvo de rocas)
 - Otros:

Uso previo

- ¿Cuánto tiempo ha estado esta parcela bajo producción agrícola continua?
- ¿Qué uso tenía este suelo antes de su cultivo actual?
- Si practica rotación de cultivos, describa por favor una rotación típica para esta parcela

Historia de patógenos y problemas fitosanitarios

- ¿Qué problemas con microorganismos patógenos o insectos plaga del suelo ha tenido en esta parcela?

Valoración subjetiva de la calidad del suelo

- ¿Como considera usted la calidad de su suelo?
Pésima Mala Regular Buena Muy buena Excelente
- ¿Qué prácticas ejecuta para mantener o mejorar la calidad de su suelo?

Descripción del sitio

Código de muestreo:

Pendiente (estimar el % de pendiente y orientación):

Plano Ligera Moderada Fuerte

Homogeneidad del suelo:

Heterogéneo 1 2 3 4 5 Homogéneo

Propenso a inundación: Si No

Estacionalidad de las precipitaciones (marcar los meses de lluvia):

E F M A M J J A S O N D

Nivel de humedad en el suelo en el momento del muestreo

Anegado Muy húmedo Húmedo Parcialmente seco Muy seco

Anexo 2: sitios de muestreo, realización de encuesta y recolección de muestras.



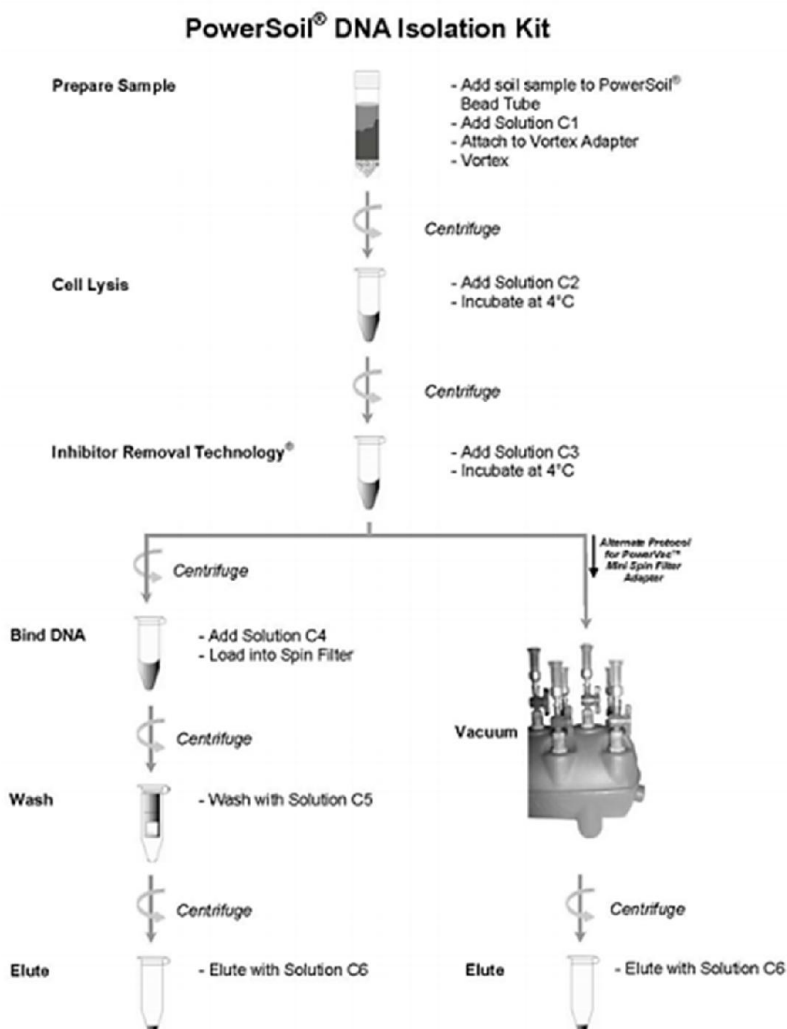
Anexo 3: preparación de muestras para los análisis físico-químicos, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente (sin exponer la muestra al sol).



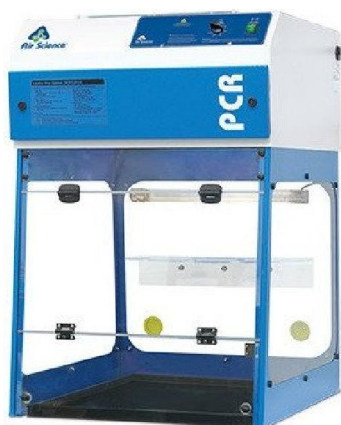
Anexo 4: preparación de muestras para la extracción de ADN metagenómico.



Anexo 5: Diagrama de Flujo del protocolo de extracción para el ADN ambiental (metagenoma) de las muestras de suelo usando el kit Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU).



Anexo 6: Equipos utilizados en el laboratorio de Biología Molecular.



Cámara de PCR



Termociclador "Eppendorf"



DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)



Transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.

Anexo 7: Análisis descriptivo de las variables estudiadas

Textura

- Arcilla**

Tabla 9: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de arcilla ($< 2 \mu\text{m}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
Arcilla Media	0,202080	0,0296774
95% de intervalo de confianza para la media	0,134945	
Límite superior	0,269215	
Media recortada al 5%	0,200194	
Mediana	0,206850	
Varianza	0,009	
Desviación estándar	0,0938482	
Mínimo	0,0505	
Máximo	0,3876	
Rango	0,3371	
Rango intercuartil	0,0897	
Asimetría	0,214	0,687
Curtosis	1,178	1,334

Tabla 10: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de arcilla.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Arcilla	0,935	10	0,497

Los resultados observados en la tabla 10 nos permiten afirmar que la variable arcilla se distribuye como una variable normal.

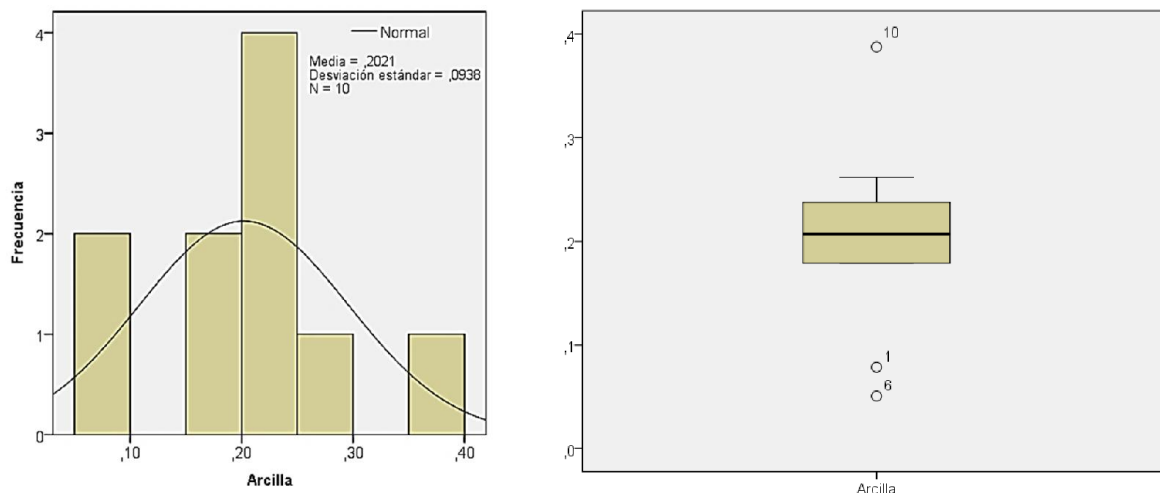


Figura 17: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de arcilla ($< 2 \mu\text{m}$).

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 17 que la observación 1, 6 y 10 son datos atípicos (1,5 veces la distancia intercuartílica).

- Limo

Tabla 11: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de limo (2-63 μm) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
Limo Media	0,271050	0,0475778
95% de intervalo de confianza para la media	0,163422	
Limite superior	0,378678	
Media recortada al 5%	0,265650	
Mediana	0,259600	
Varianza	0,023	
Desviación estándar	0,1504542	
Mínimo	0,0746	
Máximo	0,5647	
Rango	0,4901	
Rango intercuartil	0,2215	
Asimetría	0,602	0,687
Curtosis	0,346	1,334

Tabla 12: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de limo.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Limo	0,943	10	0,581

Los resultados observados en la tabla 12 nos permiten afirmar que la variable limo se distribuye como una variable normal.

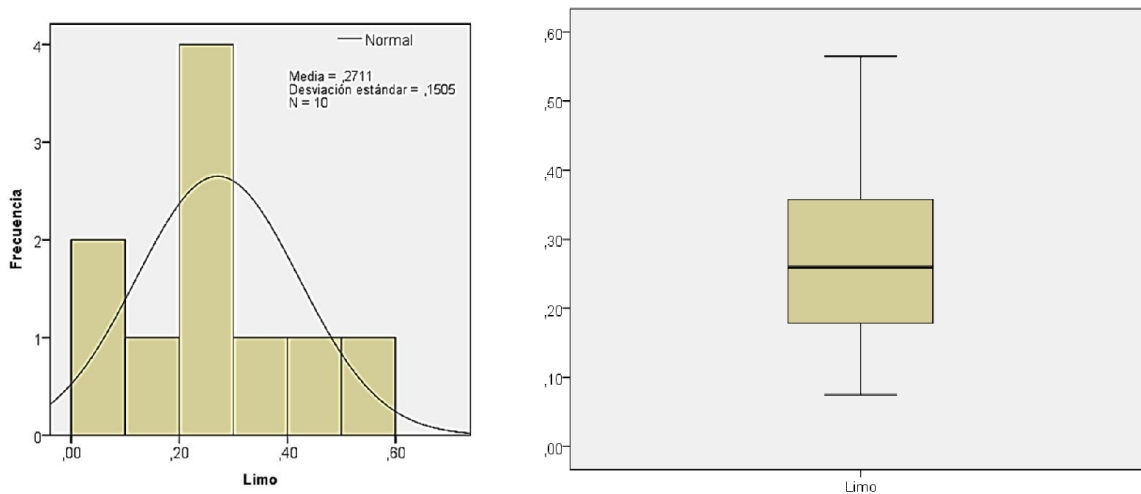


Figura 18: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de limo (2-63 μm).

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 18 que la variable cantidad de limo no presenta datos atípicos.

- **Arena**

Tabla 13: Estadísticos descriptivos de la variable física cantidad de arena (63-2000 μm) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
Arena Media	0,526860	0,0673219
95% de intervalo de confianza para la media	0,374567	
Límite superior	0,679153	
Media recortada al 5%	0,527511	
Mediana	0,529000	
Varianza	0,045	
Desviación estándar	0,2128906	
Mínimo	0,1737	
Máximo	0,8683	
Rango	,6946	
Rango intercuartil	0,2575	
Asimetría	0,274	0,687
Curtosis	0,053	1,334

Tabla 14: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física cantidad de arena.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Arena	0,944	10	0,596

Los resultados observados en la tabla 14 nos permiten afirmar que la variable arena se distribuye como una variable normal.

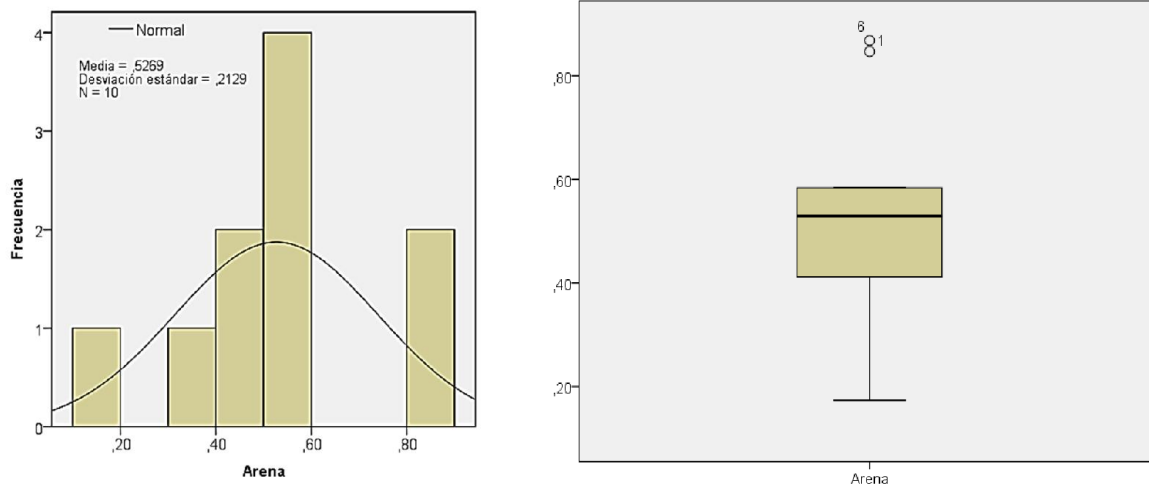


Figura 19: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable cantidad de arena (63-2000 μm).

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 19 que la observación 1 y 6 son datos atípicos (1,5 veces la distancia intercuartílica).

Densidad aparente (d.a.)

Tabla 15: Estadísticos descriptivos de la variable física (d.a.) densidad aparente (g/cm^3) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
d.a. Media	0,9448	0,06208
95% de intervalo de confianza para la media	0,8044	
Límite superior	1,0852	
Media recortada al 5%	0,9556	
Mediana	0,9640	
Varianza	0,039	
Desviación estándar	0,19630	
Mínimo	0,48	
Máximo	1,22	
Rango	0,74	
Rango intercuartil	0,16	
Asimetría	-1,434	0,687
Curtosis	3,732	1,334

Tabla 16: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física densidad aparente.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
d.a.	0,876	10	0,118

Los resultados observados en la tabla 16 nos permiten afirmar que la variable densidad aparente se distribuye como una variable normal.

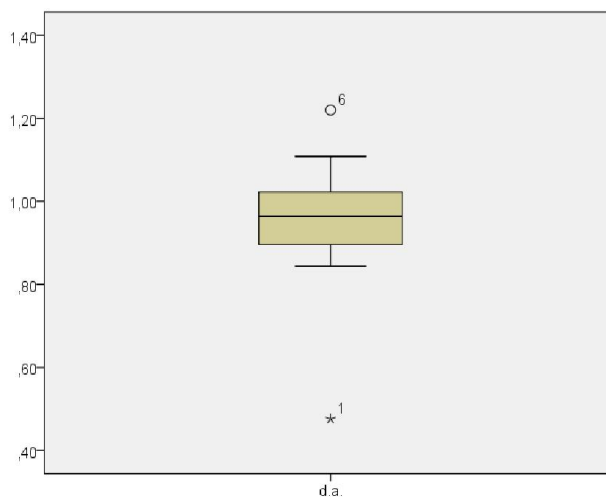
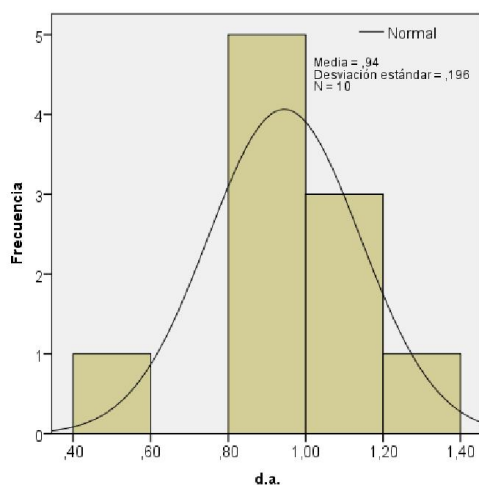


Figura 20: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable densidad aparente.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 20 que la observación 1 es un dato atípico extremo (3 veces la distancia intercuartílica); y la observación 6 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Densidad real

Tabla 17: Estadísticos descriptivos de la variable física (d.r.) densidad real (g/cm^3) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
d.r. Media	2,2900	0,04583
95% de intervalo de confianza para la media	2,1863	
Límite superior	2,3937	
Media recortada al 5%	2,2833	
Mediana	2,2000	
Varianza	0,021	
Desviación estándar	0,14491	
Mínimo	2,20	
Máximo	2,50	
Rango	0,30	
Rango intercuartil	0,30	
Asimetría	1,035	0,687
Curtosis	-1,224	1,334

Tabla 18: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física densidad real.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
d.r.	0,594	10	0,000047

Los resultados observados en la tabla 18 nos permiten afirmar que la variable densidad real no se distribuye como una variable normal, esto debido a que solo existen dos valores 2,20 y 2,50 (g/cm^3), en las demás observaciones los valores se replican.

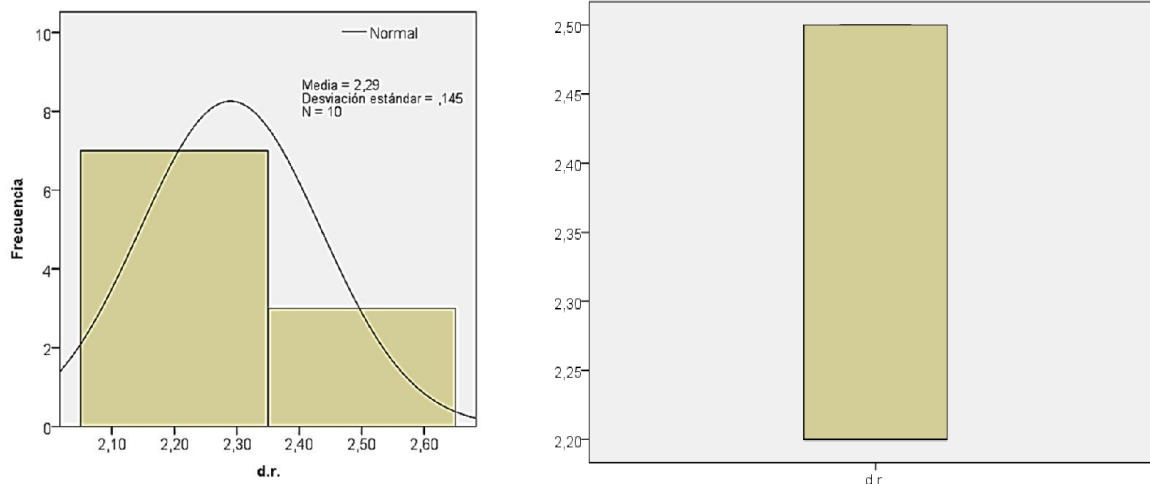


Figura 21: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable densidad real. Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 21 que para la variable densidad real no se observan datos atípicos.

Porosidad

Tabla 19: Estadísticos descriptivos de la variable física porosidad (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
Porosidad		
Media	0,590505	0,0257435
95% de intervalo de confianza para la media		
Límite inferior	0,532269	
Límite superior	0,648741	
Media recortada al 5%	0,584606	
Mediana	0,574300	
Varianza	0,007	
Desviación estándar	0,0814080	
Mínimo	0,5014	
Máximo	0,7858	
Rango	0,2844	
Rango intercuartil	0,0925	
Asimetría	1,610	0,687
Curtosis	3,465	1,334

Tabla 20: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física porosidad.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Porosidad	0,865	10	0,087

Los resultados observados en la tabla 20 nos permiten afirmar que la variable porosidad se distribuye como una variable normal.

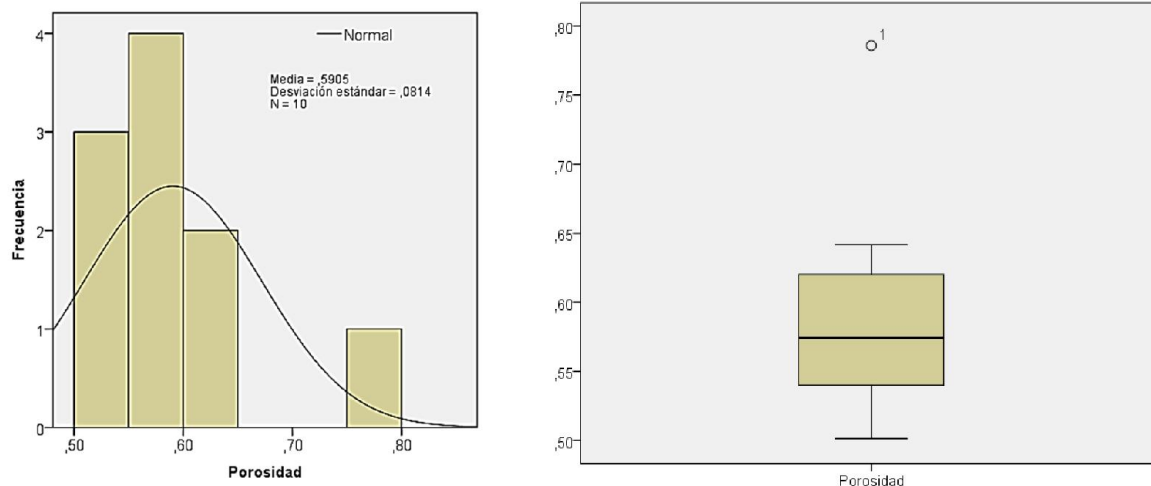


Figura 22: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable porosidad.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 22 que la observación 1 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Contenido de humedad

Tabla 21: Estadísticos descriptivos de la variable física humedad (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
Humedad	Media	0,351380	0,0330461
	95% de intervalo de confianza para la media	0,276625	
	Límite superior	0,426135	
	Media recortada al 5%	0,348339	
	Mediana	0,345150	
	Varianza	0,011	
	Desviación estándar	0,1045009	
	Mínimo	0,2000	
	Máximo	0,5575	
	Rango	0,3575	
	Rango intercuartil	0,1430	
	Asimetría	0,420	0,687
	Curtosis	0,561	1,334

Tabla 22: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física humedad.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Humedad	0,958	10	0,762

Los resultados observados en la tabla 22 nos permiten afirmar que la variable contenido de humedad se distribuye como una variable normal.

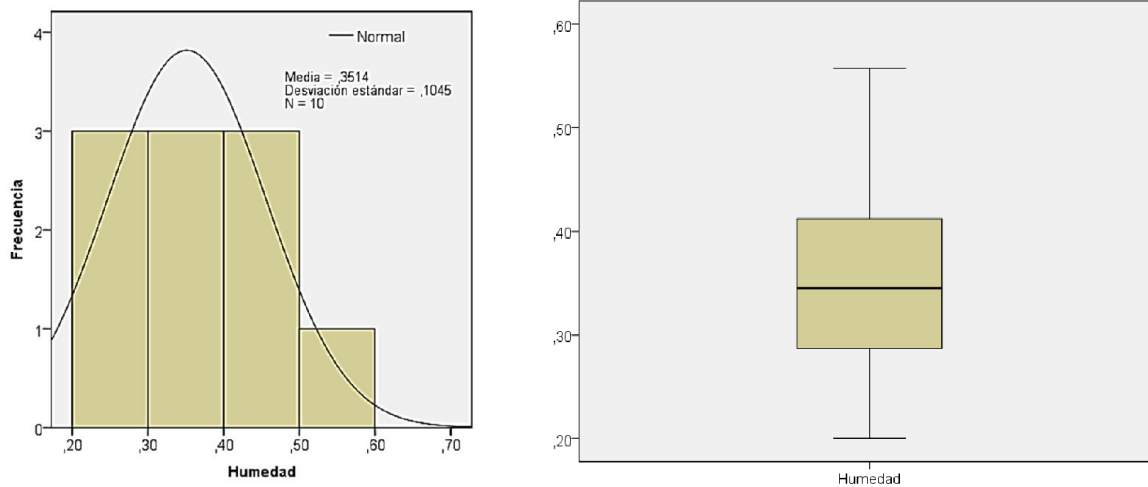


Figura 23: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable humedad.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 23 que para la variable contenido de humedad no se observan datos atípicos.

Capacidad de saturación o retención de agua

Tabla 23: Estadísticos descriptivos de la variable física Saturación de agua (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
Saturación		
Media	0,500100	0,0246732
95% de intervalo de confianza para la media	0,444285	
Límite superior	0,555915	
Media recortada al 5%	0,494111	
Mediana	0,495000	
Varianza	0,006	
Desviación estándar	0,0780234	
Mínimo	0,4180	
Máximo	0,6900	
Rango	0,2720	
Rango intercuartil	0,0867	
Asimetría	1,670	0,687
Curtosis	3,870	1,334

Tabla 24: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable física saturación de agua.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Saturación	0,842	10	0,047

Los resultados observados en la tabla 24 nos permiten afirmar que la variable saturación de agua no se distribuye como una variable normal.

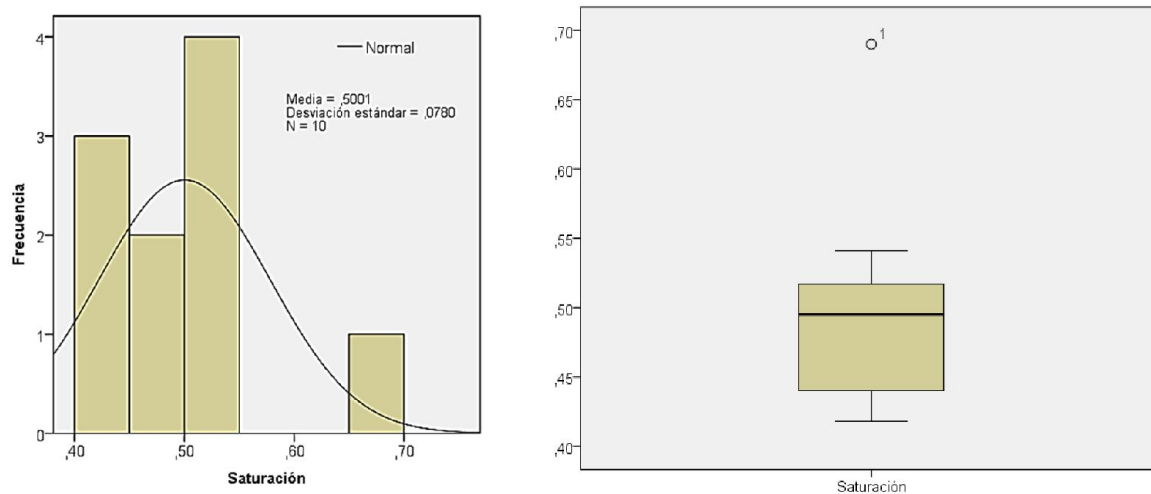


Figura 24: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable saturación de agua.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 24 que la observación 1 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Conductividad eléctrica

Tabla 25: Estadísticos descriptivos de la variable química (C.E.) Conductividad eléctrica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
C.E. Media	0,3610	0,06390
95% de intervalo de confianza para la media	0,2164	
Límite superior	0,5056	
Media recortada al 5%	0,3539	
Mediana	0,3500	
Varianza	0,041	
Desviación estándar	0,20207	
Mínimo	0,12	
Máximo	0,73	
Rango	0,61	
Rango intercuartil	0,37	
Asimetría	0,477	0,687
Curtosis	- 0,587	1,334

Tabla 26: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química conductividad eléctrica.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
C.E.	0,949	10	0,655

Los resultados observados en la tabla 26 nos permiten afirmar que la variable conductividad eléctrica se distribuye como una variable normal.

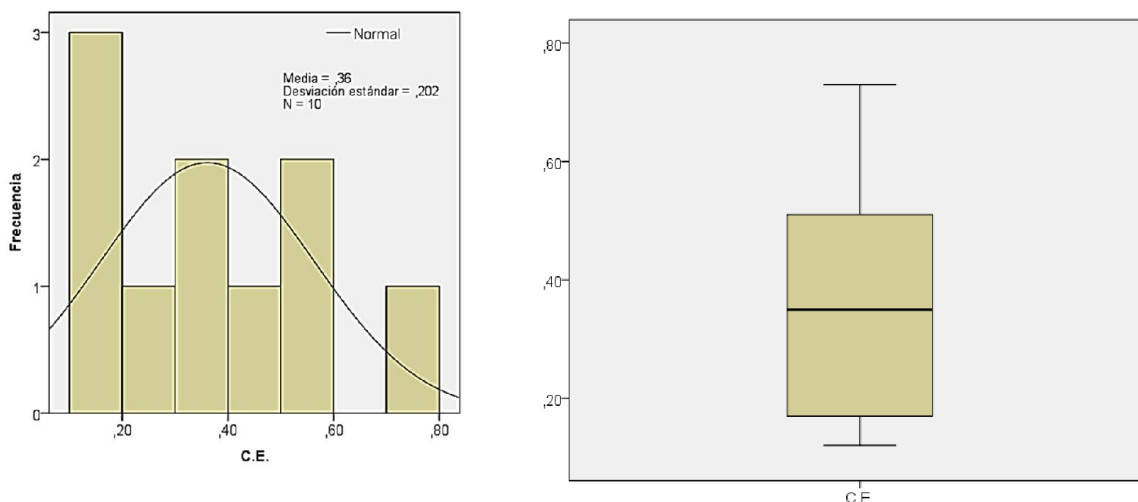


Figura 25: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable conductividad eléctrica.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 25 que para la variable conductividad eléctrica no se observan datos atípicos.

pH

Tabla 27: Estadísticos descriptivos de la variable química pH en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
pH	Media	6,1290	0,25716
	95% de intervalo de confianza para la media	5,5473	
	Limite superior	6,7107	
	Media recortada al 5%	6,1739	
	Mediana	6,3300	
	Varianza	0,661	
	Desviación estándar	0,81320	
	Mínimo	4,47	
	Máximo	6,98	
	Rango	2,51	
	Rango intercuartil	1,13	
	Asimetría	-1,245	0,687
	Curtosis	0,784	1,334

Tabla 28: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química pH.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
pH	0,858	10	0,072

Los resultados observados en la tabla 28 nos permiten afirmar que la variable pH se distribuye como una variable normal.

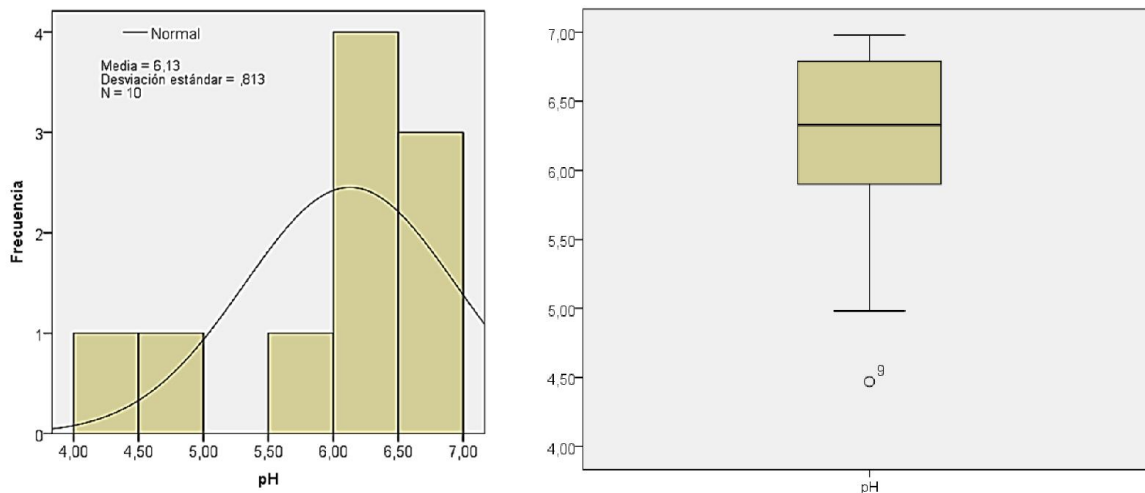


Figura 26: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable pH.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 26 que la observación 1 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Materia orgánica

Tabla 29: Estadísticos descriptivos de la variable química (M.O.S.) materia orgánica (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
M.O.S. Media	0,080900	0,0147606
95% de intervalo de confianza para la media	0,047509	
Límite superior	0,114291	
Media recortada al 5%	0,077222	
Mediana	0,069500	
Varianza	0,002	
Desviación estándar	0,0466773	
Mínimo	0,0290	
Máximo	0,1990	
Rango	0,1700	
Rango intercuartil	0,0405	
Asimetría	1,982	0,687
Curtosis	5,028	1,334

Tabla 30: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química materia orgánica del suelo.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
M.O.S.	0,807	10	0,018

Los resultados observados en la tabla 30 nos permiten afirmar que la variable materia orgánica del suelo no se distribuye como una variable normal.

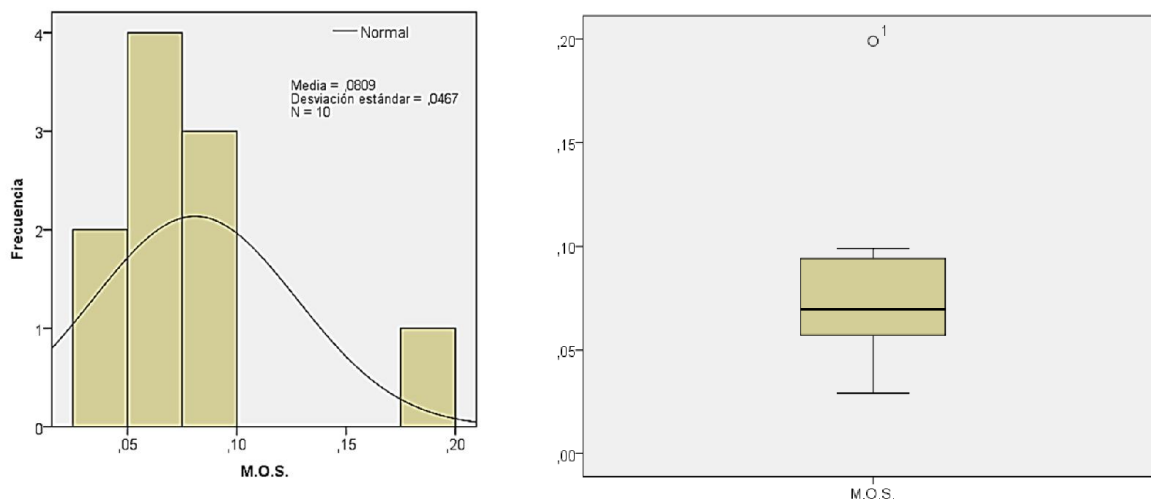


Figura 27: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable materia orgánica del suelo.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 27 que la observación 1 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Contenido de carbono orgánico

Tabla 31: Estadísticos descriptivos de la variable química (C.O.S.) carbono orgánico (%) en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
C.O.S. Media	0,046926	0,0085619
95% de intervalo de confianza para la media	0,027557	
Límite superior	0,066294	
Media recortada al 5%	0,044792	
Mediana	0,040313	
Varianza	0,001	
Desviación estándar	0,0270750	
Mínimo	0,0168	
Máximo	0,1154	
Rango	0,0986	
Rango intercuartil	0,0235	
Asimetría	1,982	0,687
Curtosis	5,028	1,334

Tabla 32: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable química carbono orgánico del suelo.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
C.O.S.	0,807	10	0,018

Los resultados observados en la tabla 32 nos permiten afirmar que la variable carbono orgánico del suelo no se distribuye como una variable normal.

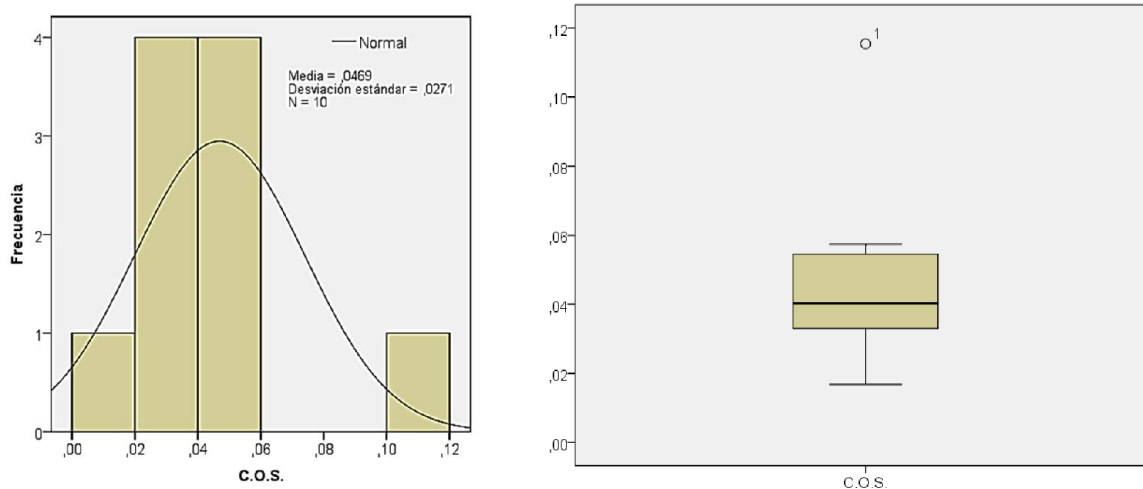


Figura 28: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable carbono orgánico del suelo.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 28 que la observación 1 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Índice de Shannon Weaver

- Comunidad fúngica

Tabla 33: Estadísticos descriptivos de la variable (H-ITS) índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
H-ITS	Media	2,5952	0,08360
	95% de intervalo de confianza para la media	2,4061	
	Límite superior	2,7843	
	Media recortada al 5%	2,5886	
	Mediana	2,5982	
	Varianza	0,070	
	Desviación estándar	0,26435	
	Mínimo	2,25	
	Máximo	3,06	
	Rango	0,82	
	Rango intercuartil	0,46	
	Asimetría	0,237	0,687
	Curtosis	- 0,577	1,334

Tabla 34: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
H-ITS	0,963	10	0,816

Los resultados observados en la tabla 34 nos permiten afirmar que la variable índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas se distribuye como una variable normal.

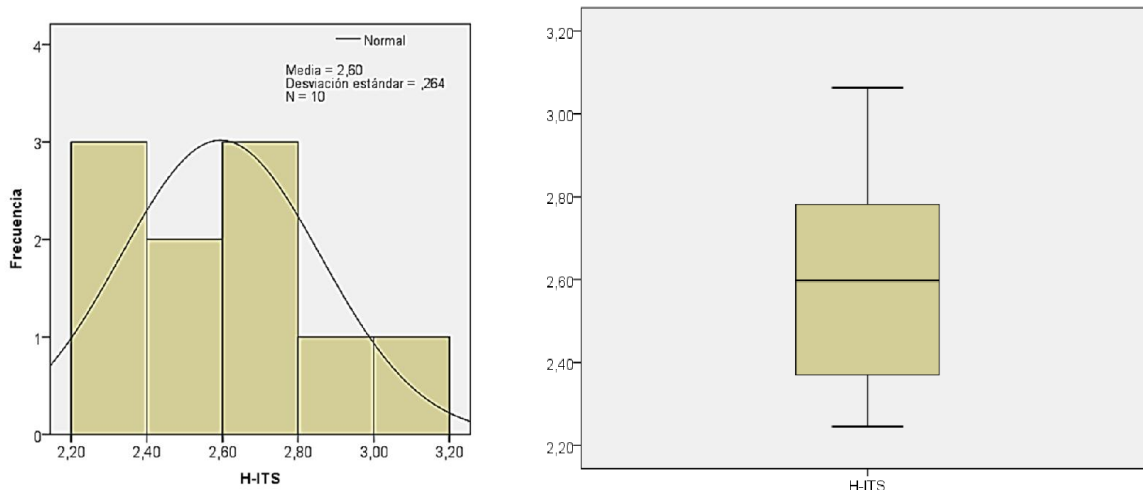


Figura 29: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable índice de Shannon Weaver en comunidades fúngicas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 29 que para la variable índice de shannon Weaver en comunidades fúngicas no se observan datos atípicos.

- **Comunidad Bacteriana**

Tabla 35: Estadísticos descriptivos de la variable (H-16S) índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
H-16S	Media	2,5817	0,11004
	95% de intervalo de confianza para la media	2,3328	
	Límite superior	2,8306	
	Media recortada al 5%	2,6078	
	Mediana	2,6953	
	Varianza	0,121	
	Desviación estándar	0,34797	
	Mínimo	1,78	
	Máximo	2,92	
	Rango	1,14	
	Rango intercuartil	0,43	
	Asimetría	-1,592	0,687
	Curtosis	2,485	1,334

Tabla 36: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
H-16S	0,842	10	0,046

Los resultados observados en la tabla 36 nos permiten afirmar que la variable índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas no se distribuye como una variable normal.

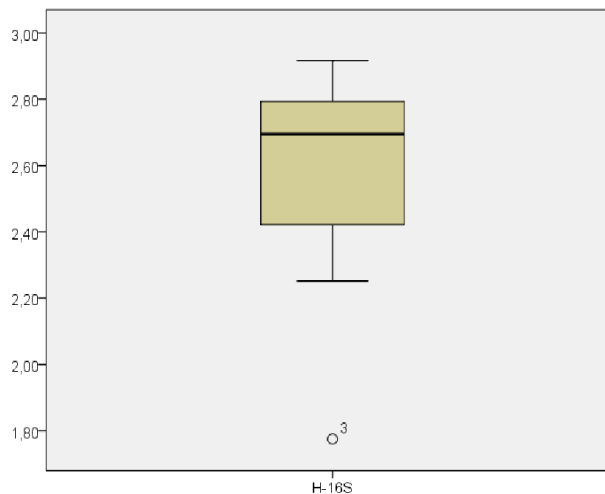
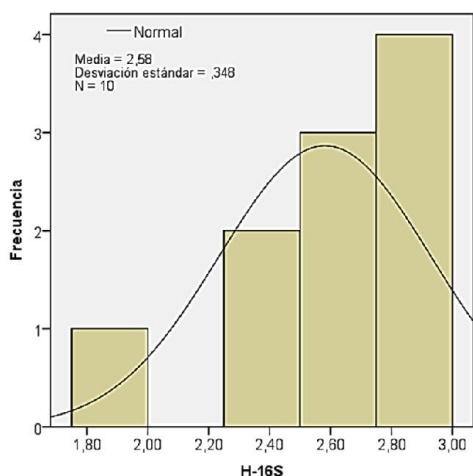


Figura 30: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable índice de shannon Weaver en comunidades bacterianas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 30 que la observación 3 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

Riqueza

- Comunidad fúngica

Tabla 37: Estadísticos descriptivos de la variable (S-ITS) riqueza en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
S-ITS	Media	16,80	1,397
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	13,64
		Límite superior	19,96
	Media recortada al 5%	16,72	
	Mediana	16,00	
	Varianza	19,511	
	Desviación estándar	4,417	
	Mínimo	10	
	Máximo	25	
	Rango	15	
	Rango intercuartil	6	
	Asimetría	0,486	0,687
	Curtosis	0,079	1,334

Tabla 38: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable riqueza en comunidades fúngicas.

Pruebas de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
S-ITS	0,975	10	0,935

Los resultados observados en la tabla 38 nos permiten afirmar que la variable riqueza en comunidades fúngicas se distribuye como una variable normal.

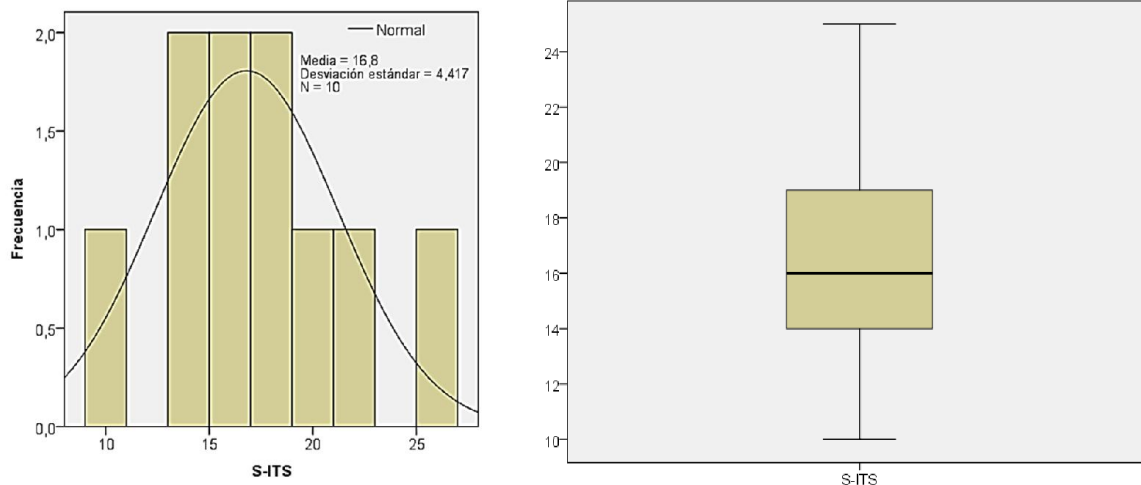


Figura 31: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable riqueza en comunidades fúngicas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 31 que para la variable riqueza en comunidades fúngicas no se observan datos atípicos.

- **Comunidad Bacteriana**

Tabla 39: Estadísticos descriptivos de la variable (S-16S) riqueza en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
S-16S Media	15,60	1,368
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
	12,51 18,69	
Media recortada al 5%	15,78	
Mediana	16,00	
Varianza	18,711	
Desviación estándar	4,326	
Mínimo	7	
Máximo	21	
Rango	14	
Rango intercuartil	7	
Asimetría	- 0,781	0,687
Curtosis	0,246	1,334

Tabla 40: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable riqueza en comunidades bacterianas.

Pruebas de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
S-16S	0,950	10	0,667

Los resultados observados en la tabla 40 nos permiten afirmar que la variable riqueza en comunidades bacterianas se distribuye como una variable normal.

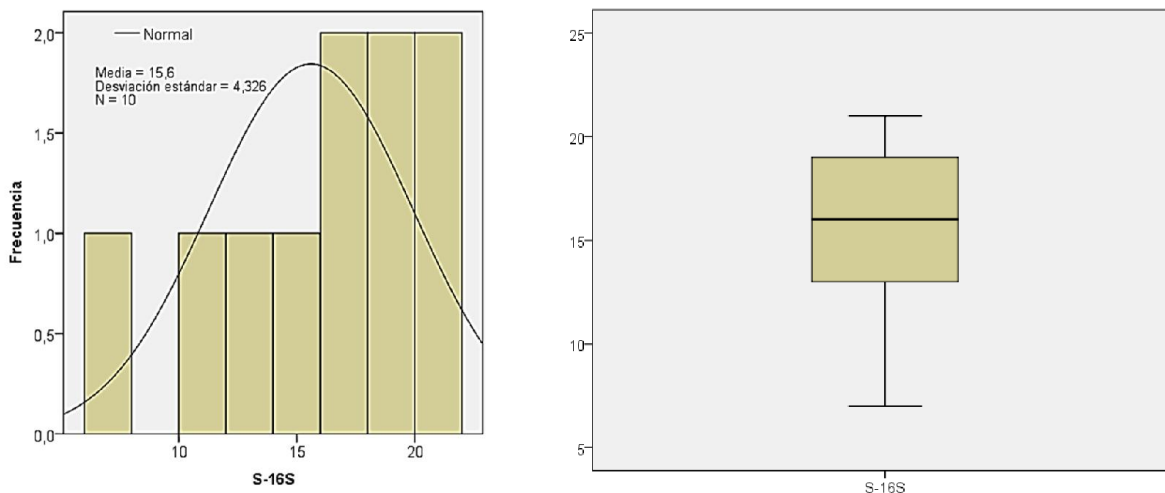


Figura 32: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable riqueza en comunidades bacterianas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 32 que para la variable riqueza en comunidades bacterianas no se observan datos atípicos.

Índice de Equitatividad

• Comunidad fúngica

Tabla 41: Estadísticos descriptivos de la variable (EH-ITS) Equitatividad en comunidades fúngicas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

		Estadístico	Error estándar
E _H -ITS	Media	0,930236	0,0103518
	95% de intervalo de confianza para la media		
	Límite inferior	0,906818	
	Límite superior	0,953653	
	Media recortada al 5%	0,931909	
	Mediana	0,931878	
	Varianza	0,001	
	Desviación estándar	0,0327352	
	Mínimo	0,8510	
	Máximo	0,9794	
	Rango	0,1284	
	Rango intercuartil	0,0231	
	Asimetría	-1,450	0,687
	Curtosis	4,318	1,334

Tabla 42: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable Equitatividad en comunidades fúngicas.

Pruebas de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
E _H -ITS	0,846	10	0,053

Los resultados observados en la tabla 42 nos permiten afirmar que la variable Equitatividad en comunidades fúngicas se distribuye como una variable normal.

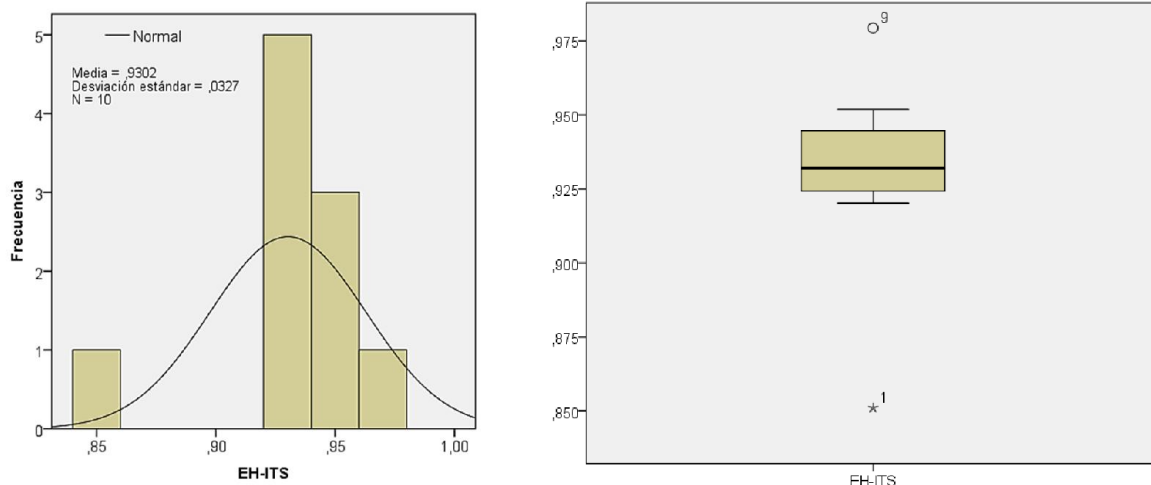


Figura 33: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable Equitatividad en comunidades fúngicas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 33 que la observación 1 es un dato atípico extremo (3 veces la distancia intercuartílica); y la observación 9 es un dato atípico (1,5 la distancia intercuartílica).

• **Comunidad Bacteriana**

Tabla 43: Estadísticos descriptivos de la variable (EH-16S) Equitatividad en comunidades bacterianas en suelos cultivados con Banano bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

	Estadístico	Error estándar
EH-16S Media	0,953341	0,0063699
95% de intervalo de confianza para la media		
Límite inferior	0,938931	
Límite superior	0,967751	
Media recortada al 5%	0,954129	
Mediana	0,953634	
Varianza	0,000406	
Desviación estándar	0,0201433	
Mínimo	0,9124	
Máximo	0,9801	
Rango	0,0677	
Rango intercuartil	0,0290	
Asimetría	- 0,681	0,687
Curtosis	0,493	1,334

Tabla 44: Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks para la variable Equitatividad en comunidades bacterianas.

Prueba de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
EH-16S	0,952	10	0,694

Los resultados observados en la tabla 44 nos permiten afirmar que la variable Equitatividad en comunidades bacterianas se distribuye como una variable normal.

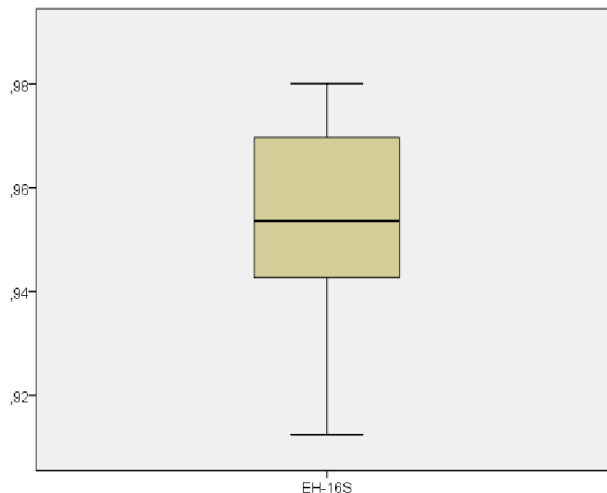
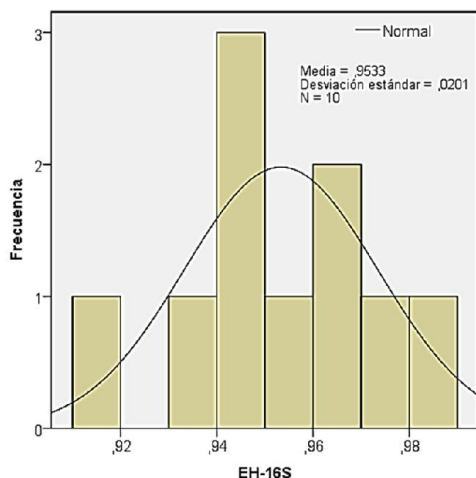
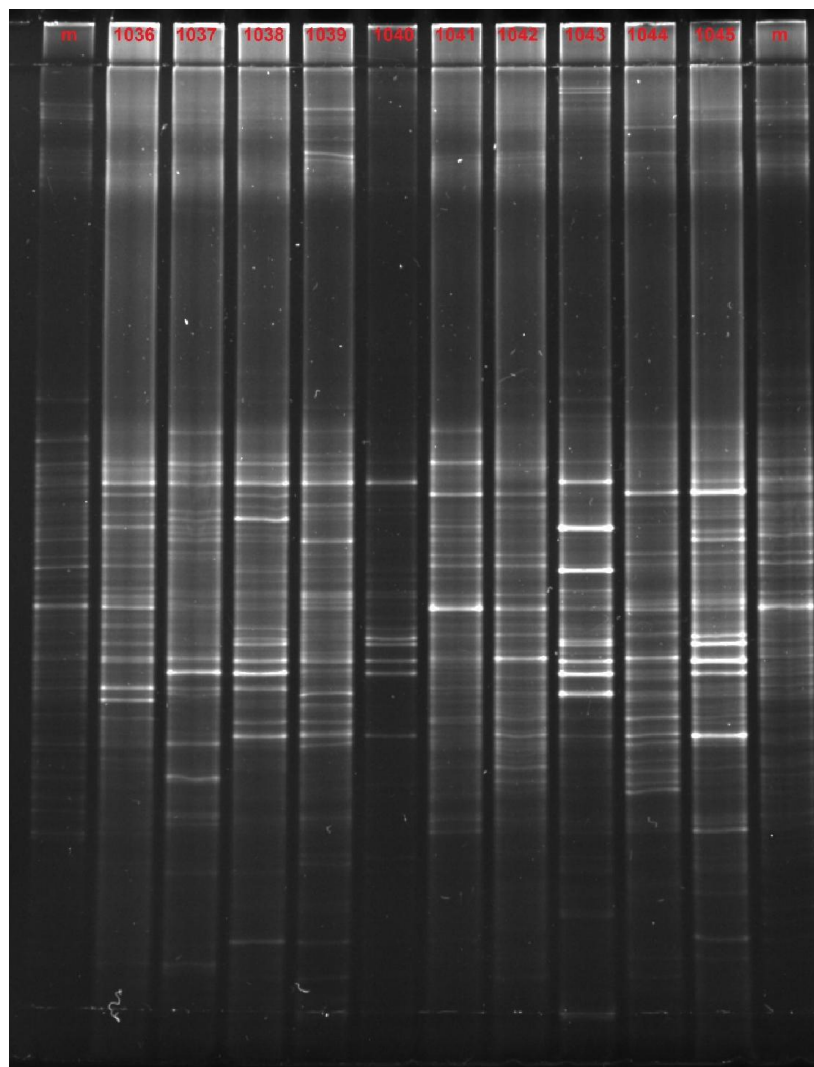


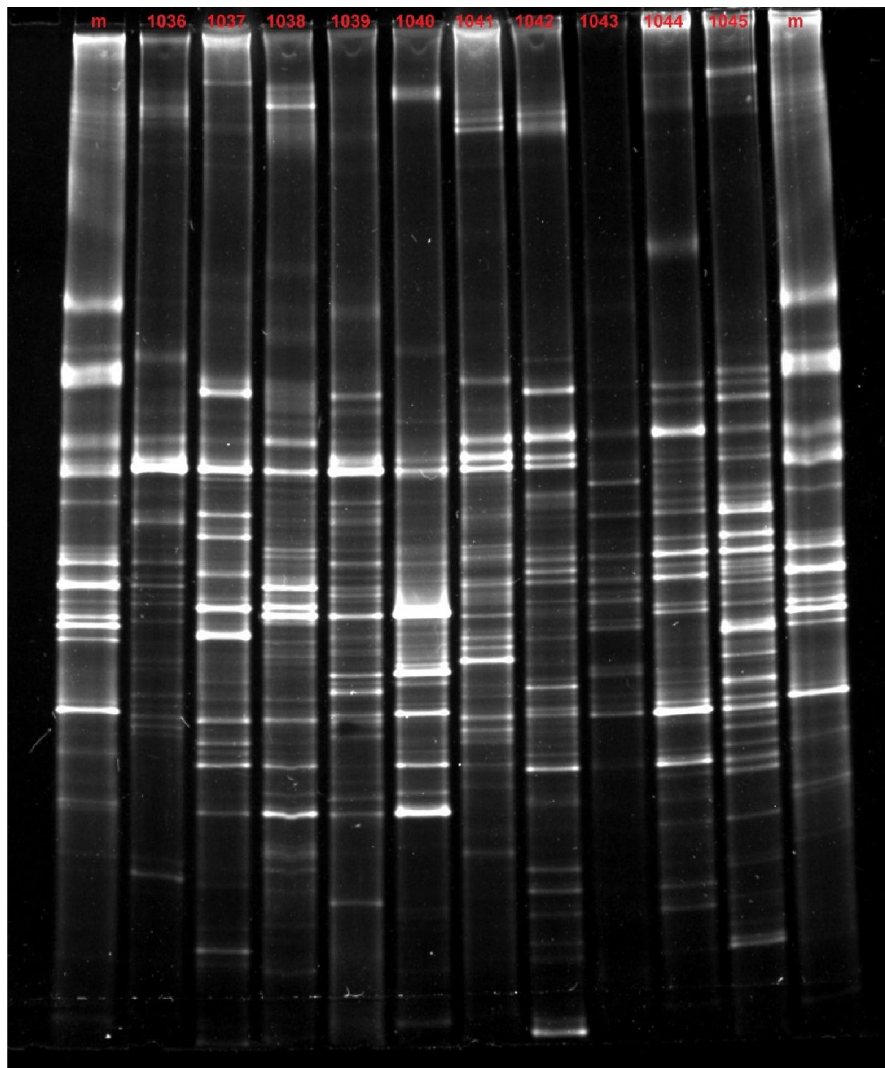
Figura 34: Histograma, curva de distribución y diagrama de cajas para la variable Equitatividad en comunidades bacterianas.

Se evidencia en el diagrama de cajas de la figura 34 que para la variable Equitatividad en comunidades bacterianas no se observan datos atípicos.

Anexo 8: Condiciones óptimas de DGGE para el ARNr 16S; imagen visualizada y fotografiada en un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System.



Anexo 9: Condiciones óptimas de DGGE para la Región ITS; imagen visualizada y fotografiada en un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System.



Anexo 10: Correlación de Rho de Spearman y Pearson entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.

Tabla 45: Correlación de Rho de Spearman entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.

		H-16S
pH	Coefficiente de correlación	0,636*
	Sig. (bilateral)	0,048
	N	10

Índice de Riqueza de Especies (**S**), Índice de Shannon Weaver (**H**), Índice de Equitatividad de Especies (**E_H**), Hongos (**ITS**) y Bacterias (**16S**).

Tabla 46: Correlación de Pearson entre los índices de riqueza y diversidad frente a las características físico-químicas en los suelos estudiados.

		H-ITS	S-ITS	EH-ITS	S-16S	EH-16S
d.a.	Correlación de Pearson	0,336	0,153	0,624	- 0,107	- 0,352
	Sig. (bilateral)	0,342	0,672	,054	0,769	0,318
	N	10	10	10	10	10
Porosidad	Correlación de Pearson	- 0,533	- 0,313	- 0,795**	- 0,334	0,284
	Sig. (bilateral)	0,113	0,378	0,006	0,346	0,427
	N	10	10	10	10	10
pH	Correlación de Pearson	0,764*	0,766**	- 0,096	0,770**	0,475
	Sig. (bilateral)	0,010	0,010	0,792	0,009	0,166
	N	10	10	10	10	10
C.E.	Correlación de Pearson	- 0,222	- 0,219	0,149	0,001	0,124
	Sig. (bilateral)	0,538	0,544	0,681	0,999	0,733
	N	10	10	10	10	10
Humedad	Correlación de Pearson	- 0,273	- 0,157	- 0,307	0,136	0,128
	Sig. (bilateral)	0,446	0,665	0,388	0,708	0,724
	N	10	10	10	10	10
Arcilla	Correlación de Pearson	0,611	0,536	0,611	0,311	- 0,413
	Sig. (bilateral)	0,060	0,111	0,060	0,382	0,236
	N	10	10	10	10	10
Limo	Correlación de Pearson	- 0,065	- 0,200	0,614	- 0,214	- 0,337
	Sig. (bilateral)	0,858	0,580	0,059	0,552	0,341
	N	10	10	10	10	10
Arena	Correlación de Pearson	- 0,223	- 0,095	- 0,703*	0,014	0,420
	Sig. (bilateral)	0,535	0,794	0,023	0,969	0,227
	N	10	10	10	10	10

Para una mejor interpretación de las variables correlacionadas se realizaron gráficos de regresión lineal, los resultados se muestran a continuación:

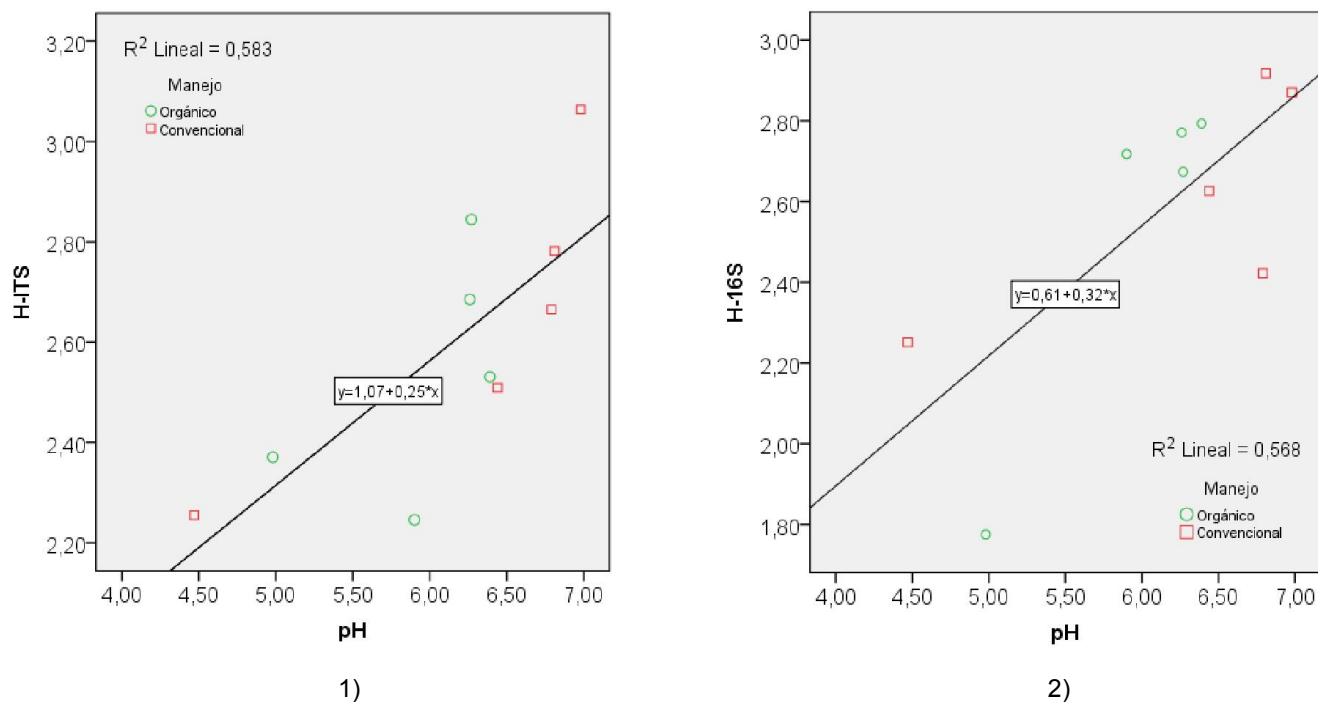
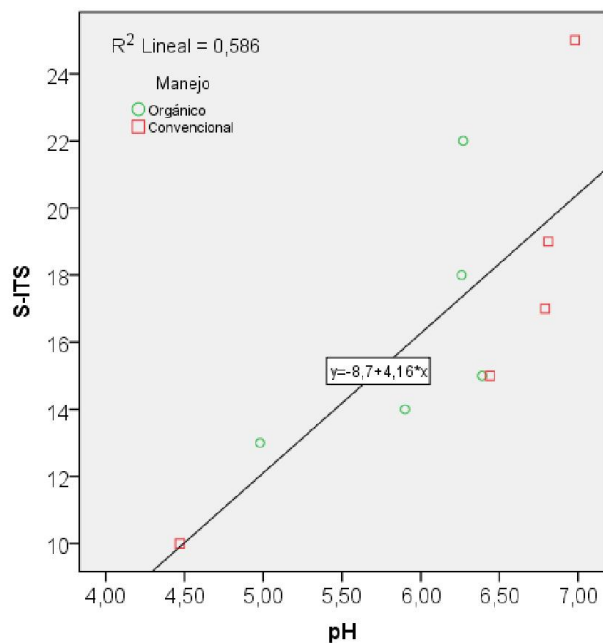
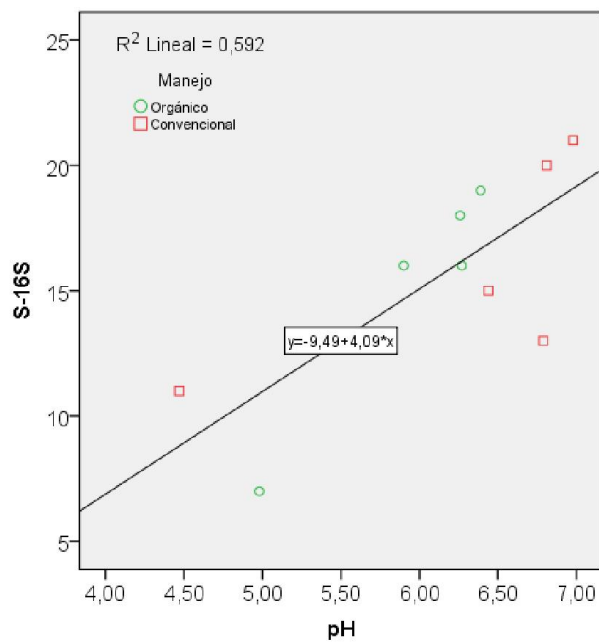


Figura 35: Correlaciones positivas significativas entre el índice de Shannon Weaver (H) con el pH, para ambas comunidades microbianas (Bacterias y hongos).

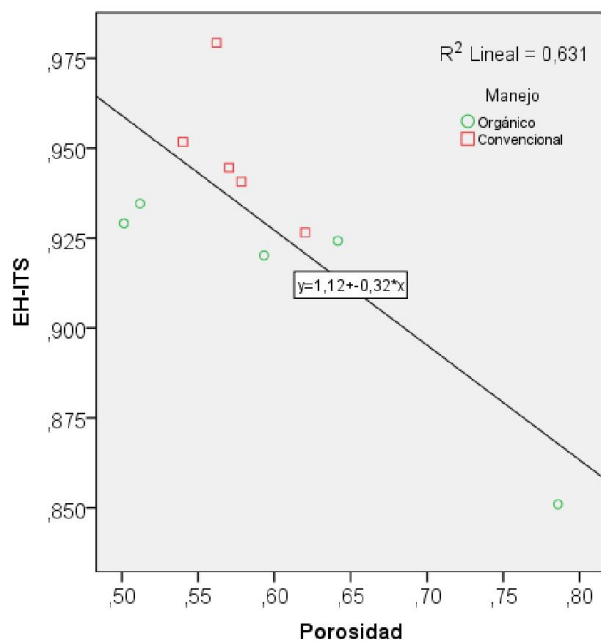


3)

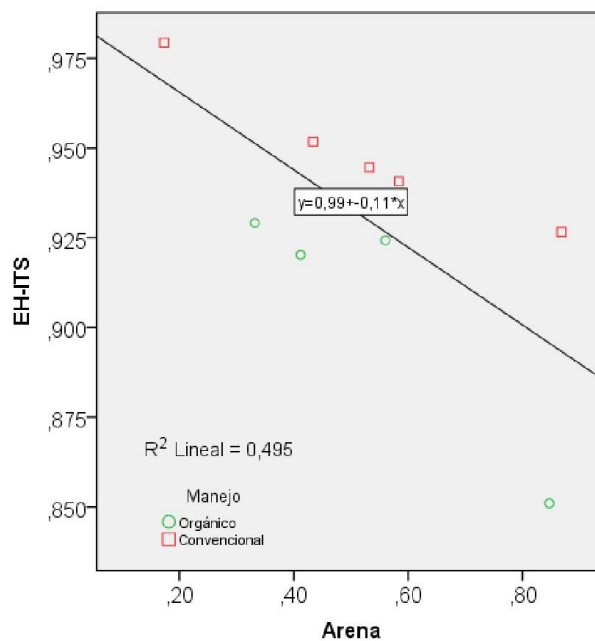


4)

Figura 36: Correlaciones positivas significativas entre la Riqueza (S) con el pH, para ambas comunidades microbianas (Bacterias y hongos).



5)



6)

Figura 37: Correlaciones negativas significativas entre la Equitatividad para las comunidades fúngicas con la porosidad del suelo y el contenido de arena.